

腎生理のトピックス —特に遺伝子改変動物とシグナル系に関して—

金井好克

はじめに

近年、遺伝子改変動物が腎生理学の研究に大きな威力を発揮している。2007年においても、遺伝子改変動物を用いた多数の研究が報告された。多くはノックアウトマウスを用いたもので、対象となる分子の予想される生理機能のノックアウトによる証明がなされ^{1~7)}、また特定の分子(受容体、シグナル分子、生理活性物質、細胞障害物質の生成・分解に関わる酵素など)のノックアウトマウスを材料として、生体に与えた負荷や刺激に対する応答をみることにより、生理機能や病態形成における重要な事実が示された^{8~10)}。意外な事実が明らかにされたものもある¹¹⁾。ノックアウトマウスの単離尿細管を用いた灌流実験も、遺伝子改変技術と従来の尿細管研究技術の融合したものとして、きわめて重要な情報を提供し、その威力を発揮している。

遺伝子改変動物では、遺伝子ノックアウトマウスのみでなく、疾患起因性変異を導入したノックインマウスが病態解析に有用で、かつ疾患モデル動物として重要な研究材料であることが示された。Uchida, Sasaki らの、アクアポリン AQP 2 遺伝子異常による優性遺伝形式の腎性尿崩症の分子病態の解明¹²⁾、WNK キナーゼ異常による偽性低アルドステロン症 II 型 (PHA II) の病態解明¹³⁾がその例である。

また、腎尿細管トランスポーター・イオンチャネルを調節するシグナル系の研究においても大きな成果が発表された。前述の PHA II 変異ノックインマウスの解析から、レニン-アルドステロン-ENaC 系に並ぶ WNK-OSR1/SPAK-NCC という新たな腎臓での容量調節系が存在することが示唆された¹³⁾。また、アルドステロンによる ENaC の調節に Sgk1-Nedd4-2 経路が知られているが、これと併行して

機能すると考えられる新たな ENaC 調節機構として、脱ユビキチン化酵素 Usp2-45 が、Sgk1 同様アルドステロンにより誘導される遺伝子として見出された¹⁴⁾。

本稿では、非常に重要な成果をあげた 2 つの疾患起因性変異のノックインマウスについて概説し、多くの報告がなされているノックアウトマウスを用いた腎生理機能の研究のいくつかを取り上げて紹介したい。さらに、電解質調節に関わるシグナル系、また、その他の領域においても興味深い進展について解説を加えたい。

AQP2 遺伝子異常による優性遺伝形式 腎性尿崩症の分子病態の解明¹²⁾

AQP 2 遺伝子異常による腎性尿崩症は一般には常染色体劣性遺伝形式を示すが、優性遺伝形式を示すものが存在し、それにおいては、遺伝子のフレームシフト変異により、AQP 2 の C 末端が本来のものとは異なったものとなる。この変異 AQP 2 のノックインマウスが作られ、ヒトにおける優性遺伝形式と矛盾せず、ヘテロマウスにおいて尿崩症を発症することが確認された。

非常に興味深いことに、本来集合管の管腔側に存在すべき AQP 2 が、この変異 AQP 2 ノックインマウスでは、血管側に見出された。しかも、この変異 AQP 2 は、正常の AQP 2 を引き連れて血管側に位置し、わずかな正常の AQP 2 が管腔側に残った形となっている。これは、AQP 2 が 4 量体として機能するため、変異 AQP 2 を 1 つでも持つ 4 量体は血管側にソーティングされるとすると理解できる。このようなドミナントネガティブ効果が優性遺伝形式を示す腎性尿崩症の原因であることが、変異 AQP 2 ノックインマウスにより明らかにされたわけである。本来の局在部位とは逆側へソーティングされる変異 AQP 2 は、遺伝子のフレームシフトにより C 末端細胞内ドメインに 2 つのロイシン残

基が連続する配列が出現するが、これが逆側へのソーティングの原因となることも明らかになった。

変異により管腔側/血管側ソーティングが逆になることは、まだ十分に解明されていない管腔側/血管側局在機構への貴重な手がかりであり、このノックインマウスは、優性遺伝形式の腎性尿崩症の疾患モデルとして有用であるとともに、この重要な生理学の課題の解決への糸口となる可能性がある。

WNK キナーゼ異常による偽性低アルドステロン症 II 型 (PHA II) の病態解明¹³⁾

偽性低アルドステロン症 II 型 (PHA II) は優性遺伝形式をとる高血圧性疾患であり、高カリウム血症、アシドーシスを呈し、尿細管での NaCl 再吸収の亢進がその原因とされてきた。サイアザイドにより病態が改善することから、当初、サイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体 (NCC) の異常が想定された。しかし、実際には NCC の遺伝子異常は見出されず、ポジショナルクローニングにより、2 つの WNK キナーゼ WNK1 と WNK4 の遺伝子が責任遺伝子であることが示された。

WNK キナーゼと NaCl 再吸収との関連をつかむため、いくつかのグループが、アフリカツメガエル卵母細胞や哺乳類培養細胞に WNK とそれによりリン酸化されると予想されるトランスポーターやチャネルを強制発現させる研究を行ったが、満足できる結果は得られなかった。そこで、WNK4 の PHA II 変異ノックインマウスが作製された。

ノックインマウスでは、WNK キナーゼによりリン酸化することが知られていた OSR1/SPAK キナーゼが確かにリン酸化されて活性化していた。さらに、OSR1/SPAK キナーゼの下流にあると想定されていたサイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体 NCC のリン酸化の亢進が観察された。リン酸化 NCC は管腔側膜に強く限局しており、さらに行われたクリアランス測定と尿細管灌流実験の結果を加味して、このようなリン酸化経路による NCC 機能の過剰発現が PHA II の病態を生じさせる要因であることが示された。この系は、PHA II の病態形成に関わるだけでなく、レニン-アルドステロン-ENaC 系に並ぶ WNK-OSR1/SPAK-NCC という新たな腎臓での容量調節系を形成することが示唆されている。

この研究は、疾患起因性変異ノックインによる病態モデルマウスを用いて、トランスポーター制御の新たなシグナル伝達系を明らかにしたものであり、遺伝子改変動物の威

力がフルに活用されたとともに、*in vivo* の研究の重要性を再認識させるものであった。また、シグナル分子の機能変化がトランスポーター機能の大きな変動を引き起こす実態が解明された点でも、この研究の意義は大きい。

遺伝子ノックアウトマウスを用いた検討

1. 流量依存的 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇における $P2Y_2$ 受容体の関与⁷⁾

尿細管腔内液の流量の上昇は、尿細管上皮細胞の細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇を引き起こす。尿細管上皮細胞への機械的刺激は一般に ATP/UTP の放出を引き起こし、autocrine, paracrine 機序により $P2$ 受容体の活性化を生じる。

髄質側の太いヘンレの上行脚 (mTAL) の主要な $P2$ 受容体は $P2Y_2$ 受容体であり、管腔側、血管側ともに存在していた。単離した mTAL の流量を上昇させると尿細管上皮 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇したが、この上昇は、 $P2Y_2$ 受容体ノックアウトマウスでは大きく減弱していた。流量上昇に対する応答は、細胞外 ATP の排除およびスラミンによる $P2$ 受容体の抑制により同様に減弱した。以上より、流量依存的 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の背後に、ATP 放出- $P2Y_2$ 受容体の活性化があることが実証された。

2. TPRV5 の遠位曲尿細管での Ca^{2+} 再吸収への関与の再評価¹⁾

遠位曲尿細管の管腔側の Ca^{2+} 透過型カチオンチャネル TPRV5 は、遠位曲尿細管での Ca^{2+} 再吸収を担うとされている。また、遠位曲尿細管細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を防ぎ、 Ca^{2+} 上昇による細胞障害から保護するために、 Ca^{2+} 結合蛋白である calbindin- D_{28K} が、 Ca^{2+} を結合して血管側の Ca^{2+} 排出機構へとシャトルしている。 Ca^{2+} チャネルである TPRV5 と calbindin- D_{28K} のどちらが Ca^{2+} 再吸収の律速段階となっているかを明らかにするために、TPRV5 と calbindin- D_{28K} のノックアウトマウスを用いた検討がなされた。その結果、TPRV5 のノックアウトマウスで尿中 Ca^{2+} 排泄が増加するが、calbindin- D_{28K} のノックアウトマウスでは変化せず、TPRV5 が“gatekeeper”として Ca^{2+} 再吸収の律速段階を形成していることが実証された。calbindin- D_{28K} は、calbindin- D_{9K} などの他の Ca^{2+} 結合蛋白により代償されると考えられる。

3. Anion exchanger AE1 欠損の遠位尿細管性アシドーシスへの関与の実証⁵⁾

Anion exchanger AE1 (Band3) の遺伝的欠損は、ヒトにおいては遠位尿細管性アシドーシスの病態を示す。anion

exchanger AE1 ノックアウトマウスも典型的な遠位尿細管性アシドーシスを示し、AE1 は酸・塩基平衡の維持に大きく寄与していることが実証された。

4. Na/K/2Cl トランスポーター NKCC2 の spliced variant の機能の解析³⁾

トランスポーターには多くの spliced variant が知られており、N-末端、C-末端のわずかな入れ替わりを含めると相当な数が存在すると予想される。多くのものは、*in vitro* の検討では大きな機能的差異はなく、その機能的意義の推察は難しい。薬物感受性も変化しないものが多く、特定の spliced variant を選択的に抑制することが困難である点も解析が遅れている原因となっている。ここにおいてもジーンターゲットングによる spliced variant 選択的な遺伝子ノックアウトが有用な研究手段となる。

Na/K/2Cl トランスポーター NKCC2 には、NKCC2A、NKCC2B、NKCC2F の 3 つの spliced variant が知られており、NKCC2F は髄質の、NKCC2B は主に皮質の、NKCC2A は皮質から髄質にかけてのヘンレの太い上行脚に存在する。緻密斑においても NKCC2A と NKCC2B は共存している。NKCC2A の機能的意義を明らかにするため、NKCC2A のノックアウトマウスが作製された。その解析の結果、NKCC2A は高 Cl⁻ 側での緻密斑における塩感知機構に重要な役割を果たしていることが明らかになった。緻密斑における高親和性、低親和性の 2 つの NKCC2 の spliced variant の存在が、広い Cl⁻ 濃度範囲での緻密斑の応答性を保証していることが示唆された。

新たな ENaC 調節因子としての脱ユビキチン化酵素 Usp2-45 の発見¹⁴⁾

標的尿細管細胞へのアルドステロンのホルモン作用は、上皮型 Na チャネル (ENaC) の細胞膜発現と機能の調節を介して発揮される。アルドステロンは、serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) を誘導するが、この Sgk1 がユビキチンリガーゼである Nedd4-2 をリン酸化し、リン酸化された Nedd4-2 は ENaC の C-末端の PY モチーフへの結合能を失い、ENaC をユビキチン化できなくなる。これにより ENaC の細胞膜上での存在量が増加し、チャネル活性が高まるというシナリオがすでにできあがっている。

しかし、これ以外に ENaC 制御機構が存在するであろうことは、C-末端の PY モチーフを欠いて Sgk1 に対する結合能を失った Liddle 症候群型変異 ENaC-β サブユニットに対しても、アルドステロンは Na⁺ 輸送を活性化するとい

う事実をもとに想像されていた。

Verrey らは、長年にわたりアルドステロンにより誘導される遺伝子の探索を行ってきたが、*in vivo* で Sgk1 同様にアルドステロンにより速やかに誘導のかかる遺伝子として、DNA マイクロアレイを用い新たに Usp2-45 を同定した。Usp2-45 は、ユビキチン選択的なプロテアーゼであり、ユビキチン化された ENaC を脱ユビキチン化し、細胞膜上での ENaC の存在量を増やし、ENaC 活性を上昇させる。脱ユビキチン化酵素 Usp2-45 は、Sgk1-Nedd4-2 経路と併行して機能すると考えられる新たな ENaC 調節機構であることが示唆される。

メサンギウム細胞の収縮応答における TRPC1 の関与⁴⁾

メサンギウム細胞の収縮性は、細胞内 Ca²⁺ により制御され、細胞外からの Ca²⁺ 流入がその重要な要素を担っているとされている。TRPC1 (canonical transient receptor potential 1) は、多くの細胞において Ca²⁺ 透過性カチオンチャネルとして機能するが、メサンギウム細胞のアンジオテンシン II に対する収縮性応答における TRPC1 の抑制効果が、*in vitro* および *in vivo* の系で検討された。

RNA 干渉や TRPC1 中和抗体により TRPC1 を抑制すると、アンジオテンシン II に対するメサンギウム細胞の収縮性応答および Ca²⁺ 流入が抑えられた。さらに、TRPC1 中和抗体をラットに投与することにより、アンジオテンシン II やエンドセリン-1 による GFR の変動が抑えられた。TRPC1 が、メサンギウム細胞の収縮性を制御する分子機構の重要な部分を担うことが示唆されている。

おわりに

以上概説したように、遺伝子改変動物は生理学研究において大きな成果を出し続けている。これは、組織・臓器の統合的機能の *in vitro* での研究が困難な腎臓において特に顕著である。遺伝子ノックアウトマウスに加え、疾患起因性変異のノックインマウスの解析により、病態の理解のみならず、新たな生理機能が明らかになりつつある。同時に、ポストゲノムの技術による調節機構の解明に向けた研究の進歩も目覚ましい。本稿でも取り上げたように、ENaC 周辺はますます理解が深まってきている。また、WNK キナーゼから NCC に至る新たな電解質調節機構の存在が提唱され、今後の動向が注目される。

文 献

1. Gkika D, Hsu YJ, van der Kemp AW, Christakos S, Bindels RJ, Hoenderop JG. Critical role of the epithelial Ca^{2+} channel TRPV5 in active Ca^{2+} reabsorption as revealed by TRPV5/calbindin-D28K knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 2954-2956.
2. Hasegawa M, Kusahara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y. Multidrug resistance-associated protein 4 is involved in the urinary excretion of hydrochlorothiazide and furosemide. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 37-45.
3. Oppermann M, Mizel D, Kim SM, Chen L, Faulhaber-Walter R, Huang Y, Li C, Deng C, Briggs J, Schnermann J, Castrop H. Renal function in mice with targeted disruption of the A isoform of the Na-K-2Cl co-transporter. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 440-448.
4. Du J, Sours-Brothers S, Coleman R, Ding M, Graham S, Kong DH, Ma R. Canonical transient receptor potential 1 channel is involved in contractile function of glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 1437-1445.
5. Stehberger PA, Shmukler BE, Stuart-Tilley AK, Peters LL, Alper SL, Wagner CA. Distal renal tubular acidosis in mice lacking the AE1 (band3) $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (slc4a1). *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 1408-1418.
6. Ronzaud C, Loffing J, Bleich M, Gretz N, Gröne HJ, Schütz G, Berger S. Impairment of sodium balance in mice deficient in renal principal cell mineralocorticoid receptor. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 1679-1687.
7. Jensen ME, Odgaard E, Christensen MH, Praetorius HA, Leipziger J. Flow-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase depends on nucleotide release and subsequent purinergic signaling in the intact nephron. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 2062-2070.
8. Cunningham R, Brazie M, Kanumuru S, Xiaofei E, Biswas R, Wang F, Steplock D, Wade JB, Anzai N, Endou H, Shenolikar S, Weinman EJ. Sodium-hydrogen exchanger regulatory factor-1 interacts with mouse urate transporter 1 to regulate renal proximal tubule uric acid transport. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 1419-1425.
9. Zuber AM, Singer D, Penninger JM, Rossier BC, Firsov D. Increased renal responsiveness to vasopressin and enhanced V2 receptor signaling in *RGS2*^{-/-} mice. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 1672-1678.
10. Babilonia E, Lin D, Zhang Y, Wei Y, Yue P, Wang WH. Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in mediating the effect of K restriction on ROMK channels and renal K excretion. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 2037-2045.
11. Huls M, Kramers C, Levchenko EN, Wilmer MJ, Dijkman HB, Kluijtmans LA, van der Hoorn JW, Russel FG, Maser-eeuw R. P-glycoprotein-deficient mice have proximal tubule dysfunction but are protected against ischemic renal injury. *Kidney Int* 2007 ; 72 : 1233-1241.
12. Sohara E, Rai T, Yang SS, Uchida K, Nitta K, Horita S, Ohno M, Harada A, Sasaki S, Uchida S. Pathogenesis and treatment of autosomal-dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin 2 mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 14217-14222.
13. Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, Ohno M, Uchida K, Lin SH, Moriguchi T, Shibuya H, Kondo Y, Sasaki S, Uchida S. Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II : generation and analysis of a *Wnk4*(D561A/+) knockin mouse model. *Cell Metab* 2007 ; 5 : 331-344.
14. Fakitsas P, Adam G, Daidié D, van Bemmelen MX, Fouladkou F, Patrignani A, Wagner U, Warth R, Camargo SM, Staub O, Verrey F. Early aldosterone-induced gene product regulates the epithelial sodium channel by deubiquitylation. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 1084-1092.