

第 37 回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞記念講演 1

# Polycystin-1 の糖鎖と細胞内局在の異常が AQP11 ノックアウトマウスの嚢胞腎形成を引き起こす

Aberrant glycosylation and localization of polycystin-1 caused polycystic kidney in an AQP11 knockout model

井上 佑一

Yuichi INOUE

常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は、日本では約4,000人に1人の割合で発症する頻度の高い遺伝性疾患であり、日本には約3万人もの患者がいることが知られている。ADPKDの患者では、腎臓のさまざまな部位の尿細管が拡張し嚢胞を形成するが、その嚢胞が徐々に増大・拡張し、最終的に腎機能は廃絶する。原因遺伝子としては、polycystin-1(PC-1)をコードする*PKD1*と、polycystin-2(PC-2)をコードする*PKD2*が知られており、それぞれ85~90%、10~15%を占める。PC-1は462kDの分子量の大きな蛋白であり、一方、PC-2は110kDの蛋白である。PC-1/2は、尿細管細胞の細胞膜や絨毛に存在し、細胞膜上で複合体を形成し、Caチャンネルとして機能することが知られている。嚢胞形成に関与するシグナル経路としてはさまざまな経路が知られているが、嚢胞形成の病態メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。また、同じ遺伝子変異を持つ同一家系内でも嚢胞進展の速さが違うことから、嚢胞進展に遺伝子変異以外の要素が関与している可能性が示唆されてきた。

今回われわれは、ADPKDの嚢胞腎形成メカニズムを解明する手がかりとして、多発性嚢胞腎をきたすマウスであるAQP11ノックアウトマウス(AQP11KO)を解析することとした。

AQP11は、13個のAQPファミリーのなかでもかなり異なった遺伝子配列や構造を持つAQPとして知られている。AQP11は、プロテオリポソームなどの解析では水透過性を有するが、生体内におけるAQP11の局在や働きは明らかに

なっていない。また、AQP11KOの腎臓は多発性嚢胞腎を呈し、腎不全と成長障害により早期に死亡することが報告されているが<sup>1)</sup>、生体内におけるAQP11の局在や機能、そしてAQP11KOにおける嚢胞腎形成メカニズムはいまだ解明されておらず、polycystinなどの嚢胞性腎疾患原因蛋白の関与もいまだ不明であった。

今回の研究では、まず、AQP11を検出できる良い抗体が存在しないため、N末端に3×HAのついたAQP11を発現するようなAQP11 BACトランスジェニックマウス(TgAQP11)を作製し、AQP11の生体内での局在を明らかにすることを目的とした。さらに、polycystinなどの嚢胞腎原因蛋白を検討し、AQP11KOの嚢胞腎形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。

まず、前述のようなTgAQP11を作製し、3×HAのついたAQP11が腎臓で発現していることを、HA抗体を用いてのウエスタンブロッティングにて確認した。続いて3×HAのついたAQP11が、内因性のAQP11と同様に生体内で機能するかを確認するために、TgAQP11とAQP11(+/-)マウスを掛け合わせ、3×HAのついたAQP11のみを持つマウスを作製し、嚢胞腎の形成や体重減少などのAQP11KOの形質が、3×HAのついたAQP11によって緩和されるかを確認した。3×HAのついたAQP11のみを持つマウスでは、腎臓での嚢胞形成や体重減少が緩和され、3×HAのついたAQP11がマウス生体内で内因性のAQP11と同様に機能することを証明した。

続いて、TgAQP11におけるAQP11の腎臓での局在を調べるために抗HA抗体を用いての免疫染色を行ったところ、AQP11は近位尿細管の細胞質内に存在することが明らか

かになった。AQP11KO マウスの腎囊胞の由来を尿細管マーカーでの免疫染色で調べたところ、主に近位尿細管由来であり、AQP11 の局在と一致していることがわかった。

さらに、AQP11 の細胞内局在を検討するために、各種オルガネルマーカーとの二重染色を行ったところ、AQP11 が近位尿細管の小胞体に存在することが明らかになった。腎臓の小胞体分画のウェスタンブロッティングでも同様の結果を得た。

AQP11 が存在する小胞体は、新しく合成された蛋白の品質管理や膜輸送に必要不可欠な役割を果たすことが知られており、われわれは AQP11KO において、AQP11 が存在しないことにより小胞体が機能不全を起こし、PC-1/2 の量や質に異常が起きているのではないかと仮説を立て検証した。

AQP11KO の腎臓のウェスタンブロッティングを行ったところ、野生型マウスに比べて PC-1 の量は増え、PC-2 の量は減っていた。さらに、AQP11KO の腎臓においては PC-1 蛋白のサイズが野生型マウスよりも大きく、その違いが PNGase の脱糖鎖反応によって消失したことから、糖鎖異常によるものであることが明らかになった。また、AQP11KO の腎臓ではすべての PC-1 が EndoH 感受性を示したことから、PC-1 の小胞体からゴルジ体への輸送障害が示唆された。

このように、AQP11KO の腎臓では PC-1 の小胞体からゴルジ体への輸送障害が示唆されたため、AQP11KO の腎臓において、PC-1 の細胞膜への輸送異常が起きているかについても検討を行った。

免疫染色に用いることのできる PC-1 の良い抗体が存在しないため、PC-1 の細胞内局在の検討には密度勾配分画法や生体内蛋白ビオチン化法を用いた。マウス腎臓の密度勾配分画法を行って PC-1 蛋白の細胞内局在を評価したところ、AQP11KO 腎臓では PC-1 蛋白の細胞膜での発現が減少しており、生体内蛋白ビオチン化でも同様の結果が得られた。以上より、AQP11KO の腎臓では、PC-1 の細胞膜への輸送異常が起きていることが明らかになった。

さらに、PC-1 の細胞膜への輸送異常による PC-1 の機能喪失が AQP11KO の囊胞腎形成に関与するかを明らかにするために、Pkd1 ノックアウトマウスと AQP11KO を掛け合わせ、Pkd1 (+/-)AQP11 (-/-) マウスを作製することで AQP11KO の囊胞腎が悪化するかを検討した。生後 12 日で検討したところ、Pkd1 (+/-) マウスは囊胞腎を呈さなかった。しかし、Pkd1 (+/-)AQP11 (-/-) マウスは AQP11 (-/-) に比して重度の囊胞腎を呈した。腎臓の重さが体重のなかで占める割合を示す %KW/BW や、BUN などの値も、Pkd1

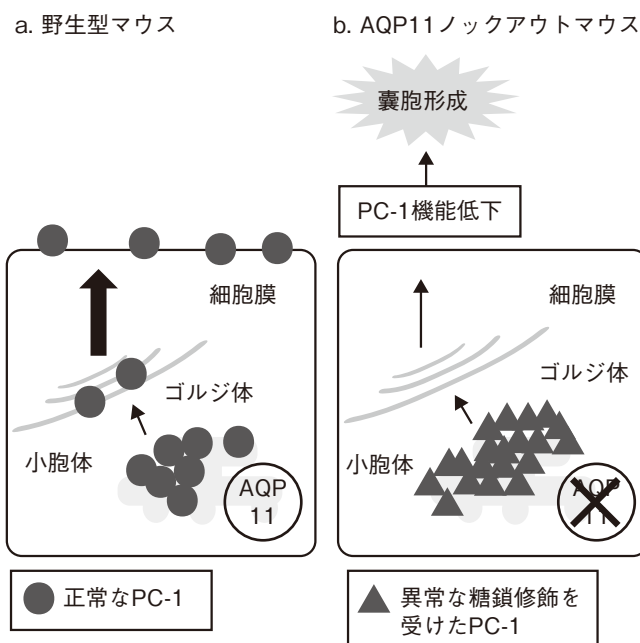


図 AQP11 ノックアウトマウスにおける囊胞形成メカニズム

(+/-)AQP11(-/-)マウスでは、AQP11(-/-)に比して優位に悪化を認めた。以上より、PC-1 の糖鎖と細胞膜輸送の異常が AQP11KO の囊胞形成の主要な機序であることが示唆された。

このように、AQP11KO における囊胞腎形成は、糖鎖の異常と細胞膜輸送の異常によって引き起こされた PC-1 の機能低下がその主要な原因であると考えられた(図)。今回の結果から、小胞体の機能異常が囊胞腎形成と密接にかかわっている可能性が示唆され、小胞体の機能低下を引き起こす恐れのある環境因子が多発性囊胞腎の増悪因子となる可能性が示唆された。

AQP11KO の腎臓において、小胞体ストレスが亢進していることが報告されている<sup>2)</sup>。小胞体ストレスを引き起こす因子としては糖尿病や感染などが知られており、実際、ADPKD の糖尿病患者では腎臓のサイズが大きいという報告もある。小胞体ストレスを引き起こす因子を防ぐことが小胞体の機能維持につながり、ひいては多発性囊胞腎の増悪を抑制する可能性が示唆され、現在さらに検討を進めている。

このように、近位尿細管小胞体の機能異常が囊胞腎形成と密接にかかわっているという新たなエビデンスは、今後の囊胞腎の病態解明と治療薬開発に貢献する可能性がある。

### 謝 辞

最後にこの研究を支えてくださった、蘇原映誠先生、小林克樹先生、千賀宗子さん、頼 建光先生、石橋賢一先生、堀江重郎先生、Xuefeng Su 先生、Jing Zhou 先生、佐々木 成先生、内田信一先生をはじめ、すべてのラボと関係者の方々に心より感謝致します。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

### 文 献

1. Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-chikuma M, Andoo A, Shimono M, Matsuki A, Kobayashi K, Ikeda M, Yamamoto T, Verkman A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K. Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol Cell Biol* 2005 ; 25 : 7770-7779.
2. Okada S, Misaka T, Tanaka Y, Matsumoto I, Ishibashi K, Sasaki S, Abe K. Aquaporin-11 knockout mice and polycystic kidney disease animals share a common mechanism of cyst formation. *FASEB J* 2008 ; 22 : 3672-3684. doi : 10.1096/fj.08-111872. Epub 2008 Jul 7.