

第4回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞講演

上皮細胞における PKA 依存性シグナルの系統的解析

Systems-level identification of PKA-dependent signaling in epithelial cells

磯部 清志

Kiyoshi ISOBE

はじめに

アクアポリン 2 (AQP2) は腎集合管に存在し、尿細管より水の再吸収の役割を担っている。AQP2 の調節障害は尿崩症や低ナトリウム血症などの病態を引き起こす原因となる¹⁾。V₂ 受容体変異による腎性尿崩症などは、現在、有効な治療法がなく、また V₂ 受容体拮抗薬であるバズタンは、心不全や肝硬変に伴う浮腫、低ナトリウム血症に対する重要な治療法の一つとなり、protein kinase A (PKA) 抑制作用を利用して常染色体優性多発性嚢胞腎の進行抑制に対しても使用されている。AQP2 の調節系を詳細に解明することは、临床上においても新たな創薬などの観点から重要な課題である。AQP2 の活性は下垂体より分泌されるバズプレシンによりその機能を調節されている。バズプレシンによる生理的作用は、培養細胞やマウスなどでさまざまな観点から明らかになっているが、生理的作用へのシグナル伝達機構の詳細は不明であった。われわれは、バズプレシンの下流に存在する PKA ノックアウト (KO) 腎集合管培養細胞を作製し、定量的リン酸化プロテオミクスを用いて PKA 下流シグナルを網羅的に解析した。その解析結果を使用し、これまでのバズプレシンの生理的作用を説明するシグナル伝達系を作成した。

バズプレシンの生理的作用

バズプレシンは基底側に存在する G 蛋白共役型受容体 (GPCR) である V₂ 受容体に結合し G_{αs} を活性化する。この

活性化によりアデニル酸シクラーゼが活性化し、細胞内サイクリック AMP (cAMP) が増加する。この cAMP の増加は PKA の活性化につながり、以後、下流のシグナルに伝わっていく²⁾。AQP2 活性化作用につながるバズプレシンの生理的作用についてはさまざま研究が進められ知見が蓄積している。それらは大きく 2 つに大別される。一つは AQP2 のエクソサイトーシスの増加、リン酸化変化、エンドサイトーシスの低下、また細胞頂側膜付近のアクチン脱ポリマー化などにより AQP2 の細胞質より頂側膜への移動 (trafficking) を促進するという知見である。また一方は、Aqp2 遺伝子転写の増加、アポトーシスの低下、細胞内 Ca²⁺ の増加、AQP2 の安定性の増加などにより AQP2 自体の発現を増加させるという知見である。これら両者はともに AQP2 の機能が亢進する方向へ作用し、最終的に腎集合管よりの水再吸収増加につながっていく。

PKA ノックアウト (KO) 細胞の作製

PKA は制御作用を持つ regulatory subunit (PKA-R) と酵素活性を持つ catalytic subunit (PKA-C) の 2 つのサブユニットより構成されている。細胞内で増加した cAMP は PKA-R に結合することにより、PKA-C が活性化し基質のリン酸化が亢進される。われわれは PKA のシグナル伝達を調べるため PKA KO 細胞を作製した。PKA-C には α と β の 2 つの isotype (PKA-C α , PKA-C β) が存在する。マウス腎皮質集合管培養細胞を用いて PKA の酵素活性を持つこれら 2 つの PKA-C をターゲットとし、CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いてフレームシフトを組み込んだ。その結果、PKA-C α KO, PKA-C β KO, PKA double KO (α と β , dKO) 細胞を作

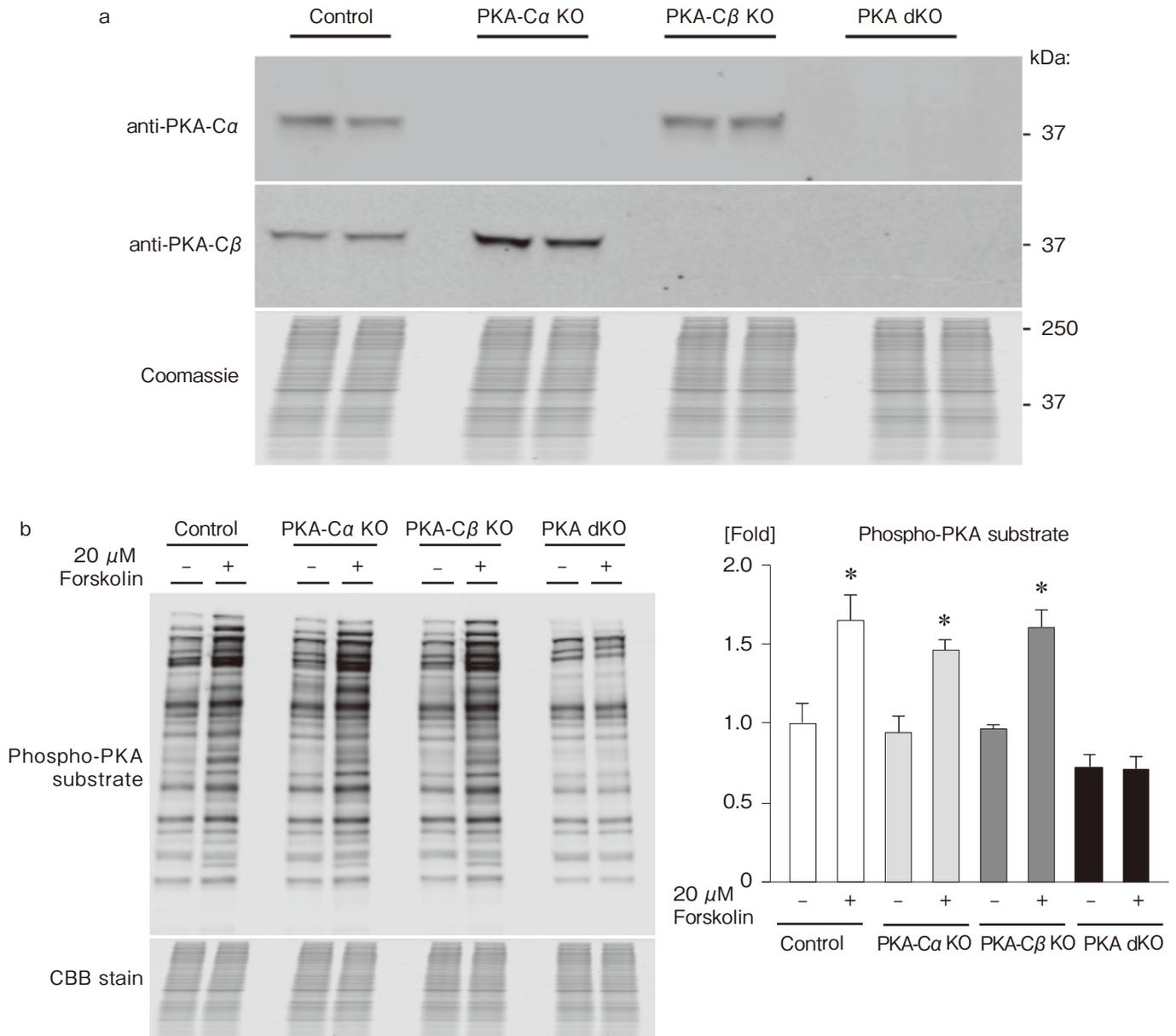


図1 PKA KO 細胞の形質

a: ウェスタンブロットによる PKA KO の確認, b: PKA KO 細胞での PKA 基質のリン酸化変化

PKA: protein kinase A, PKA-C: protein kinase A catalytic subunit, KO: knock out, dKO: PKA-C α and β double knock out

製することに成功した。ウェスタンブロットでこれらの PKA-C が発現していないことを確認し(図 1a), サンガー法でフレームシフトが組み込まれていることを確認した。PKA の基質は R-R-x-S/T という特定のモチーフ配列を持っている³⁾。この配列を持つリン酸化サイトを網羅的に認識するリン酸化 PKA 基質抗体を使用し, PKA の機能がなくなっているかを確認した(図 1b)。Control, PKA-C α KO, PKA-C β KO 細胞では細胞内 cAMP を増加させるフォルスコリンに反応して, PKA substrate のリン酸化は増加し

ているが, PKA dKO 細胞ではリン酸化の変化は認められなくなっていた。PKA dKO 細胞では PKA の酵素活性が完全に抑えられていることが確認された。

PKA KO 細胞におけるバゾプレシンの AQP2 への作用

PKA KO の AQP2 への影響をみるため, Control 細胞と PKA dKO 細胞をバゾプレシンアナログである dDAVP で刺激し比較した。まず PKA KO が AQP2 の蛋白量に与える影

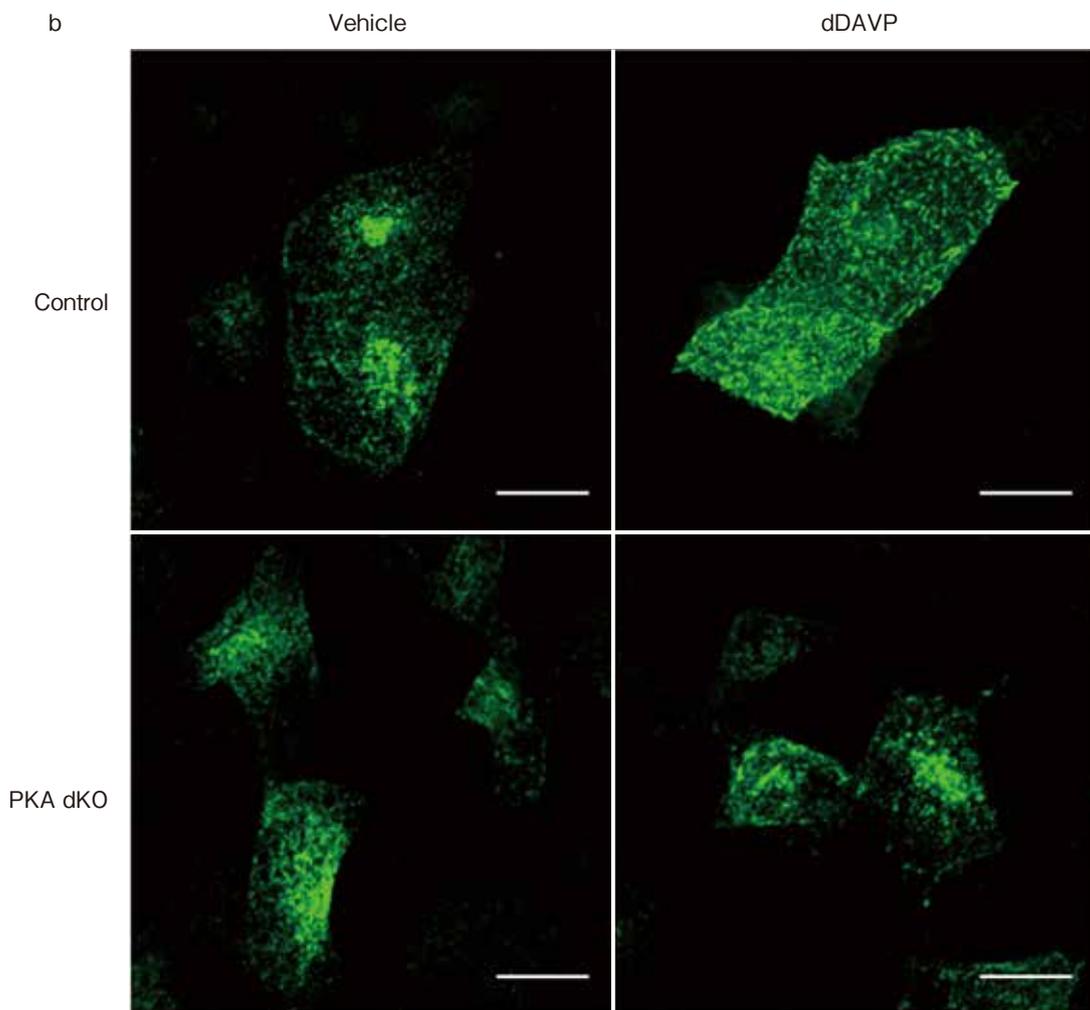
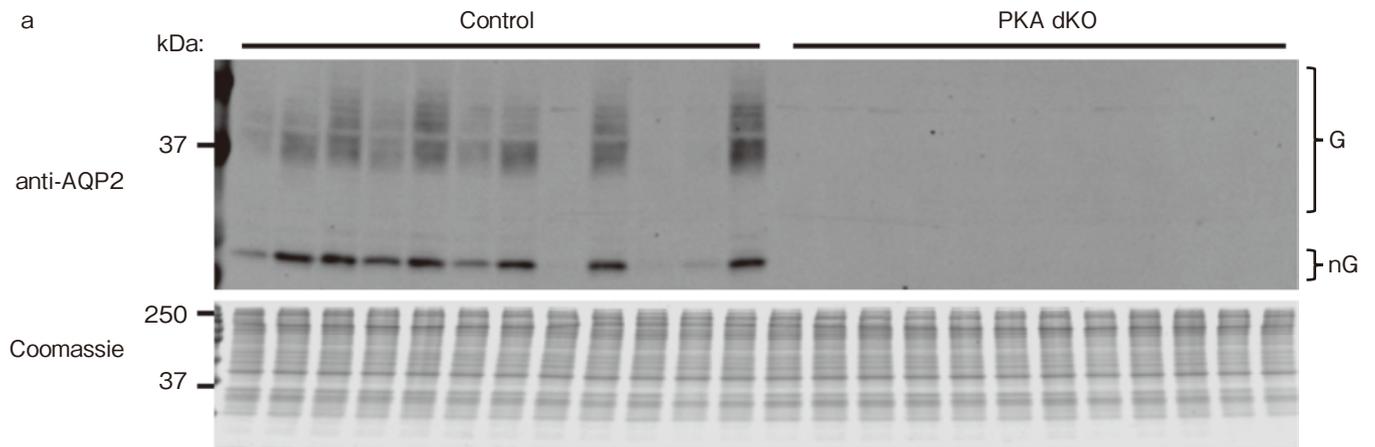


図2 PKAのAQP2への作用

a: ウェスタンブロットティングによるPKA dKOでの*Aqp2*遺伝子発現の変化

b: *Aqp2*強制発現後のPKA KO細胞でのtrafficking変化

PKA-dKO: PKA-C α and β double knock out

dDAVP: D-amino D-arginine vasopressin (desmopressin)

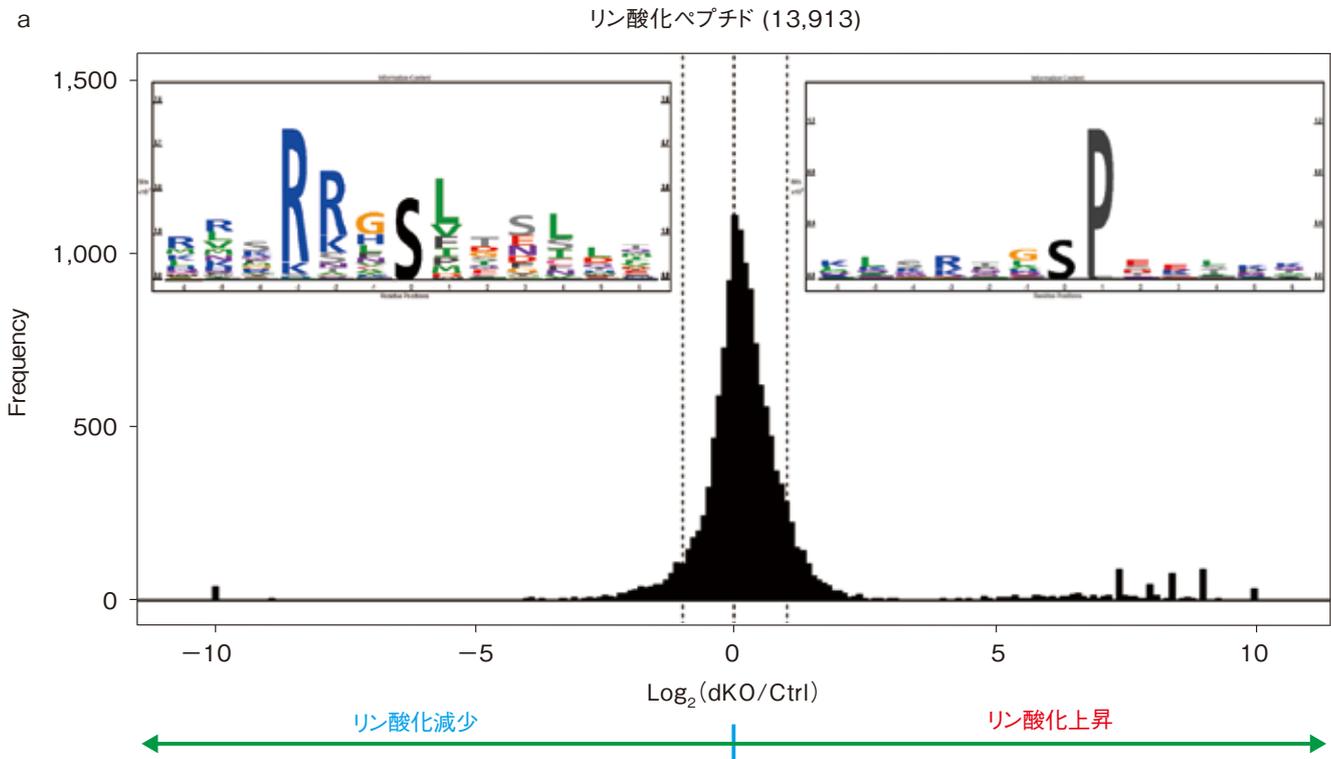


図3 PKA dKO 細胞のリン酸化プロテオミクス解析結果(1)
Control と PKA dKO 細胞でのリン酸化ペプチド比のヒストグラム

響を確認した。7日間 dDAVP で刺激した Control 細胞では AQP2 は dDAVP に反応して *Aqp2* 遺伝子の発現が認められるが、PKA dKO 細胞では *Aqp2* 遺伝子の発現は PKA dKO 細胞で完全に消失していた(図 2a)。また AQP2 の trafficking を確認した。PKA dKO 細胞では AQP2 の発現は消失してしまうため、AQP2 を Control 細胞、PKA dKO 細胞の両者に強制発現させて実験を行った。AQP2 は dDAVP に反応して、頂側膜に均一に分布するが、PKA dKO 細胞ではその反応は消失していた(図 2b)。PKA dKO 細胞ではバゾプレシンの *Aqp2* 遺伝子の発現および trafficking の作用は完全に消失していた。このことから、バゾプレシンの AQP2 に対する生理的作用は PKA を必要としていることが明らかになった。

PKA dKO 細胞を用いたリン酸化プロテオミクス解析

詳細なシグナル伝達を解析するため SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino acids in Cell culture) を用いた定量的リン酸化プロテオミクスを行った。SILAC 法は $^{12}\text{C}_6$ リジンと $^{13}\text{C}_6$, $^{14}\text{N}_4$ アルギニンを用いた培養液と $^{13}\text{C}_6$ リジンと

$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$ アルギニンを用いた培養液を使用し、それぞれで細胞を培養する。その後、細胞融解液を同じ蛋白量で混合し、トリプシン処理を行った後、リン酸化ペプチドを抽出してプロテオミクスを行った。トリプシンはリジンとアルギニン部位で蛋白を切断するため、トリプシン処理後のペプチドは理論上 1 個のリジンかアルギニンのみ含んでいる。そのため、それぞれの同位体で質量の違いを生じることにより由来が明らかになり、ペプチド量を比較することが可能となる定量的プロテオミクスの手法である。Control 細胞と PKA dKO 細胞をそれぞれの培養液で培養し、3 組のペアで同じ実験を行った。

リン酸化プロテオミクスの結果、1 組のペアでのみ検出されたものを含め、検出されたすべてのリン酸化部位は 20,335 である。そのうち少なくとも 2 組のペアで検出されたリン酸化ペプチドは 13,913 であった。この 13,913 のヒストグラムを作製し、そのアミノ酸配列パターンを解析した(図 3)。ほとんどのリン酸化部位に Control 細胞 PKA dKO 細胞で変化は認められなかった。減少しているリン酸化部位の配列を見てみると、PKA 基質として知られている好塩基性リン酸化部位が多いことがわかった。一方、上昇して

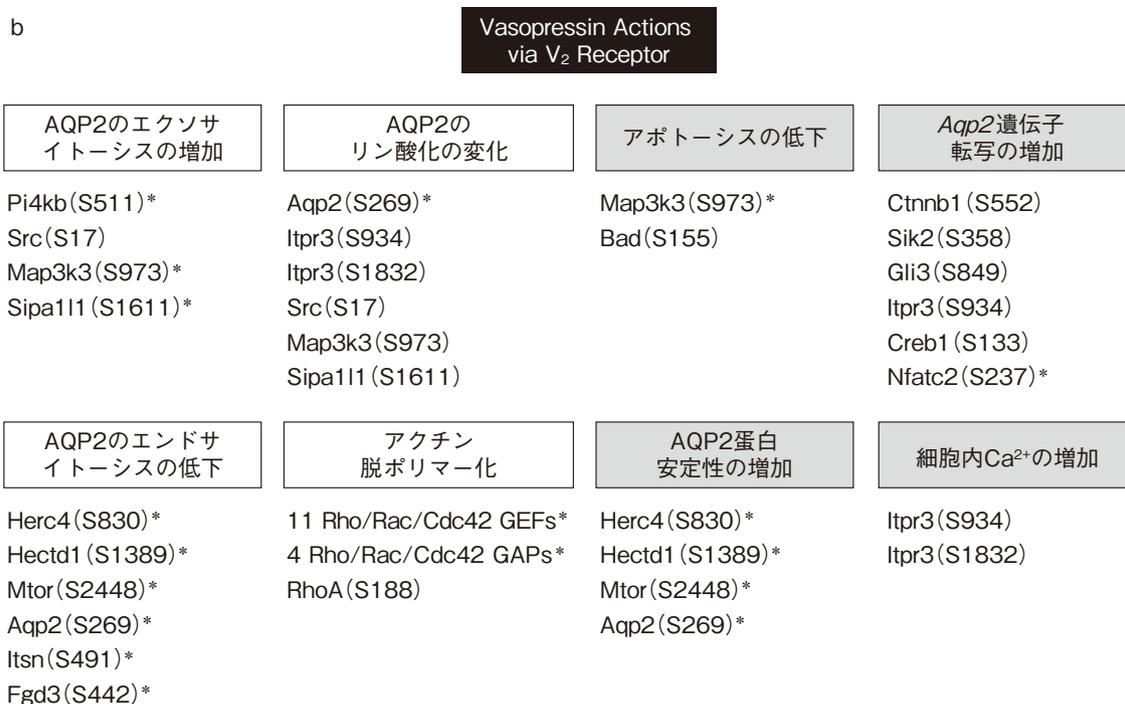


図4 PKA dKO 細胞のリン酸化プロテオミクス解析結果(2)
 バゾプレシンの生理的作用に影響のある PKA 基質。*：本研究で明らかになった PKA 基質

いるリン酸化部位はリン酸化 S/T の次がプロリンであることが多く、プロリン指向性リン酸化部位が多いことがわかった。このプロリン指向性リン酸化部位を基質とするリン酸化酵素は MAP キナーゼや cyclin-dependent キナーゼなどの CMGC キナーゼグループが知られており⁴⁾、PKA dKO 細胞ではこれらのキナーゼが活性化していることが示唆された。これらの検出された 13,913 のうち Control 細胞の 60% 未満に減少していたリン酸化部位は 1,270 検出され、そのうち PKA 基質となるモチーフ配列を持つものは 229 検出された。さらに Control 細胞の 10% 未満に減少していたリン酸化部位は 54 あった。これらは PKA の基質として考えられ、本研究により新規発見されたリン酸化部位はそれぞれ 182, 31 存在した。本研究で検出され PKA 基質と考えられるリン酸化部位を詳細に解析し、バゾプレシンの生理的作用を説明するリン酸化部位の動きをリストアップした(図4)。リン酸化部位の変化や Aqp2 遺伝子転写の増加などはある程度知見があるものであるが、本研究で新たに発見されたシグナル伝達は多く、PKA シグナル伝達に関する知見を大幅に拡大することができた。これらのバゾプレシン生理的作用のうちアクチン脱ポリマー化に焦点をあててみる(すべての解析結果は文献5を参照いただきたい)。これまでは PKA により RhoA の S188 をリン酸化することと、

詳細な機序は不明であったが一部の small GTPase が関与し、アクチン脱ポリマー化へとシグナルが伝わるのが主とされていた⁶⁾。しかし、11 個の Rho/Rac/Cdc42 GEFs や 4 個の Rho/Rac/Cdc42 GAP のリン酸化が変化していることが判明し、より複雑な制御系があることが判明した。実際にアクチンの脱ポリマー化が PKA dKO 細胞で障害されていることが確認された。

おわりに

PKA-C は α と β の 2 個の isoform を持つが、PKA-C α , β の両方を KO することで、PKA 活性を完全に抑えることができた。PKA はこれまで報告されてきたよりも、はるかに複雑で多様なシグナルにかかわっていることが明らかになった。アクチンの脱ポリマー化はその一例と考えられる。そして PKA シグナルは腎に限らず、肝臓、脂肪細胞、甲状腺や骨などさまざまな臓器で細胞外からのシグナル伝達のために重要な役割を果たしており、強心作用、抗肥満、寿命延長などとの関連が示されている因子である。本研究において PKA の詳細なシグナル解析結果が得られたことは、腎に限らず創薬研究の基盤となる情報を提供できるものと期待される。また、本研究で用いた CRISPR-Cas9 によ

るキナーゼの KO とリン酸化プロテオミクスを組み合わせる手法により、詳細なシグナル伝達の解析を網羅的に行うことが可能となった。この手法はシグナル伝達解析の強力な手法であると考えられる。

謝 辞

最後にこれまでご指導いただきました内田 信一 先生、佐々木 成先生、NIH, NHLBI System Biology Center の Mark A Knepper 先生をはじめ、すべての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. Knepper MA, et al. Molecular physiology of water balance. *N Engl J Med* 2015 ; 372 : 1349-1358.
2. Rosenbaum DM, et al. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009 ; 459 : 356-363.
3. Hutti JE, et al. A rapid method for determining protein kinase phosphorylation specificity. *Nat Methods* 2004 ; 1 : 27-29.
4. Douglass J, et al. Identifying protein kinase target preferences using mass spectrometry. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012 ; 303 : C715-C727.
5. Isobe K, et al. Systems-level identification of PKA-dependent signaling in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ; 114 : E8875-E8884.
6. Jung HJ, et al. Molecular mechanisms regulating aquaporin-2 in kidney collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016 ; 311 : F1318-C1328.