学内グラント 報告書

平成 21-22 年度 学内グラント終了時報告書

細胞分化に伴う上皮 Na チャネルの発現と 組織内局在を規定する因子の同定

研究代表者 高田 真理(医学部 生理学) 研究分担者 金子 優子¹⁾, 青葉(藤牧) 香代¹⁾, 穂苅 茂²⁾

緒言

上皮 Na channel (epithelial Na channel: ENaC) は上皮細胞膜に局在し、電解質、体液調節に関わるイオンチャネルである。例えば腎臓の尿細管、肺の上皮 Na輸送 (Na 再吸収機構) が有名である。ENaC は感覚器(味細胞、蝸牛管のReissner 膜等)にも発現している。また、およそNaの再吸収とは無縁とおもわれる哺乳類皮膚(表皮細胞)にも発現している¹⁾.表皮におけるENaCの機能は定まっていない^{2,3)}.

ENaCは α -, β -, γ -subunitの3種のsubunitからなり $2\alpha+\beta+\gamma$ の4量体で機能すると言われている¹⁾. Amiloride という薬品がありこの薬品はENaCのblockerである. 通常, 上皮全体を横切る電流(上皮電流), あるいは細胞膜を横切る電流(膜電流)がamilorideでblockされたとき,活性を持つENaCが存在しその機能がblockされたとみなされる. Amilorideblockable currentの存在は活性を持つENaCが細胞膜に局在する証である¹⁾.

人為的にsubunitの組み合わせを変えたENaCを作成し、その活性を調べた研究では、活性発現には α -subunit (α -ENaC) の存在が必須であると言われている。すなわち、 α β もしくは α γ の組み合わせはchannelとして機能するが (amilorde-blockable Na currentが流れるが)、 β γ の組み合わせでは機能しない⁴⁾。Amilorideは α -subunitをblockする δ .

両生類皮膚は後期胚発生(変態)期にその形態と機能が大幅に変化する。例えばウシガエルでは、幼生皮膚の形態は頂側にアピカル細胞を有し、魚類型であるが、成体皮膚は頂側が角化層をなし、哺乳類型である^{6,7}. 幼生皮膚にはENaC活性は無いが(幼生皮膚の上皮電流がamilorideでblockされない)、成体皮

膚には発現している (成体皮膚の上皮電流はamiloride でblockされる). 活性を持つENaC (ENaC 活性 = amiloride-blockable 反応) は変態期に発現する⁸⁻¹⁰⁾.

成体両生類皮膚は体の外側から内側に向けて皮膚を横切るNa輸送を行っている。このため哺乳類腎尿細管におけるNa再吸収機構研究のためのモデル上皮として使われてきた¹¹. 両生類皮膚は, 1)Na再吸収器官の観点からENaCの発現, 局在,活性調節を, 2)哺乳類型皮膚の観点から皮膚の形成とENaCとの関連,の両者を明らかにするための格好の素材となろう.

我々はウシガエル幼生皮膚をEDTA処理すること で、表皮が表皮幹細胞である基底細胞のみからなる皮 膚を作成でき、この試料をcorticoid 存在下で培養する と形態的にも機能的にも成体皮膚を分化誘導できるこ とを見いだした. すなわち、表皮の形態は胚芽細胞、 有棘細胞,顆粒細胞,角化細胞からなる成体型となり, 上皮電流はamilorideでblockされた. Corticoidの中で はaldosterone が最も強力であった¹²⁾. 一方, EDTA 処 理した幼生皮膚をcorticoid + prolactin (PRL) (もし くは growth hormone: GH) で培養すると幼生皮膚を 分化誘導できることを見いだした. すなわち表皮の形 態は基底膜側から、基底細胞 (basal cells)、スケイン 細胞(skein cells), アピカル細胞(apical cells)からなる 幼生型をなし、上皮電流はamilorideでblockされな かった^{13, 14)}. この事実は、例えば、corticoid 存在下の 培養ではENaCの合成が行われる、しかし、corticoid に加えてPRLが存在するとENaCは合成されない、も しくはENaCは合成されるものの細胞膜への局在に障 害が生じる、の可能性を示す. いずれにせよ、培養条 件を変えることで形態およびENaC活性の異なる皮膚 を分化誘導できるこの実験系は、本課題を研究するた めの最適の実験系の一つと考えた.

この考えに基づきわれわれは、幼生皮膚、成体皮膚、 EDTA 処理した幼生皮膚をcorticoid 存在下で培養した 高田 真理,他

ものとcorticoid + PRL存在下で培養したもの,都合 4種の皮膚を用い,RT-PCRでENaC mRNAの発現を調べた.さらに α -ENaCに対する抗体 (anti α -ENaC)を作成して幼生皮膚と成体皮膚を対象に α -ENaC 蛋白の発現と局在をwestern blotting と免疫染色で調べた.その結果,1) ENaCの3種 (α -, β -, γ -subunit) すべてのmRNAは成体皮膚ではもちろんのこと,幼生皮膚,両培養条件下の皮膚に発現していた(つまり人為的に成体皮膚/幼生皮膚の分化誘導をおこなったとき,どちらにも発現した).2) anti α -ENaCは幼生/成体皮膚の82 kDaのバンドに反応するとともに,幼生皮膚のアピカル細胞全周,成体皮膚の顆粒細胞の頂側細胞膜に反応した¹⁵.

上皮Na輸送においてNaは頂側細胞膜のENaCを 通って細胞内に入り、側底側のNa/K pump (Na/ K-ATPase) により側底側に汲み出される. そこで ENaCは上皮の頂側の細胞の, しかも頂側細胞膜に局 在している必要がある. 成体皮膚においてそこは顆粒 細胞の頂側細胞膜である. また幼生皮膚においてそこ はアピカル細胞の頂側細胞膜である. ENaCの機能発 現の見られない (amilorideという薬品で抑制される上 皮電流が見られない) 幼生皮膚でENaC mRNAが発現 していて、 α -ENaC蛋白が、たとえ全周とはいえ頂側 細胞の細胞膜に反応していた実験事実に対し、次の疑 念が浮かび上がった. 1) RT-PCRのためのサンプリン グにおいては、幼生皮膚の表皮側をスライドグラス で掻きとることで表皮を集めた. この作業においては 真皮の一部も掻きとられてしまう可能性が高い. そこ でENaC mRNAの発現が表皮を構成する、アピカル細 胞,スケイン細胞,基底細胞のどの細胞に由来するの かが明確でないとともに, 真皮の細胞に由来した可能 性も残ってしまう. さらに、ENaC mRNAがアピカル 細胞以外の細胞に由来するとすれば、なんでそんな細 胞に発現する必要があるのか?という新たな別の疑問 も生じる. そこで是非とも、幼生皮膚におけるENaC mRNAの局在を研究し、アピカル細胞に局在している のかどうかを調べる必要がある. 2) anti α -ENaC はJensik et al. 16)がクローニングしたウシガエルの α -ENaCのアミノ酸配列の一部を用いて作成した¹⁵⁾. 抗体は抗原のアミノ酸配列を識別するというよりも、 抗原分子に類似の立体構造を識別する可能性が高い. ウシガエルのアミノ酸配列の一部を利用して作成した anti α -ENaCが反応した蛋白は、立体構造が類似の、 α -ENaCとは別の蛋白である可能性もある. もしく は、抗体は真に α -ENaCと反応しているにしても、幼 生皮膚の細胞膜に局在するα-ENaCには、何かの理 由で、amiloride-blockableな反応が見られない様態を 示している可能性がある. こう考えるなら、作成した anti α-ENaCが反応しているのが (western blotting に せよ免疫染色にせよ),真にENaC蛋白なのかどうか を確定しておく必要がある.

この第一の疑念を解くために、本学内グラント研究では、*in situ* hybridizationの実験手法を用い、表皮におけるENaC mRNAの局在を調べた.

材料と方法

材料

ウシガエル (かつて Rana catesbeiana と命名されていたが、現在は Lithobates catesbeianus と呼ばれている) 幼生、成体は動物商から購入した. 幼生は MS222 存在下の冷却水で麻酔し、その後ピスし、腹部皮膚を切り出した. 成体はウレタンを脊髄腔内に注入して麻酔し、その後ピスし、腹部皮膚を切り出した.

RNAの抽出

成体皮膚の表皮側をスライドグラスで掻き取り 表皮を集めた. 全RNA (total RNA) もしくはpoly(A)* RNAs (mRNAs) を, 掻き取った表皮から分離した. 全 RNAはChomczynski and Sacchi¹⁷⁾により分離した. Poly(A)* RNAsの分離にはFastTrack Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた.

RNA probeの作成

ウシガエル成体表皮 Poly(A)* RNAsからRT-PCR 法とTA Cloning 法を用いてウシガエルの α -, β -, γ -ENaC¹⁶⁾とウシガエルの成体ケラチン(RAK; type I keratin: Suzuki et al. ¹⁸⁾)を部分クローニングし、RNA probe 作成時のテンプレートとして用いた. Digoxigenin (DIG) 標識 RNA probeの作成にはDIG RNA Labeling Kit SP6/T7 (Roche Diagnostics)を用い、RNA probeは、quick-spin column (G-50 Sepadex Columns Radiolabeled RNA Purification; Roche Diagnostics)で精製した.

Northern blot

各 DIG 標識 RNA probeの特異性を確認するためにnorthern blotを行った. ウシガエル成体表皮 Poly(A)⁺ RNAs (0.1-0.2 µg/lane) を0.22 mol/Lの formaldehydeを含む1% agarose gelでMOPS buffer 中で泳動分離した. 泳動後, RNAをNytran SuPerCharge membrane (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) に転写した. 転写膜を DIG 標識 RNA probeとhybridizeした. 転写膜は洗浄後, 非特異的シグナルをBlocking Reagent (Roche Diagnostics) でブロックし, アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) と反応させた. その後, NBT/BCIP (Roche Diagnostics) を用いた発色反応を行い, probeとRNAとのhybridizationシグナルを検出した.

In situ hybridization

切り出した幼生,成体皮膚は4% paraformaldehyde で固定した. 10-20% sucroseで置換した後, O.C.T. compoundに包埋,凍結切片を作成し,スライドグラ スに貼付けた. 凍結切片は、Protease K処理後、4% paraformaldehydeで再固定した. その後常法に従い、TEA (triethanolamine) 処理等の前処理を行い、DIG 標識 RNA probe と hybridize した. Hybridize した切片は洗浄後、RNase 処理で余剰のRNA probeを分解し、さらに洗浄した後 Blocking Reagent (Roche Diagnostics)で非特異的シグナルをブロックし、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics)と反応させた. 抗体反応後、洗浄し、NBT/BCIP (Roche Diagnostics)を用いた発色反応を行い、光学顕微鏡でprobeとmRNAとのhybridizationシグナルの局在を観察した.

結 果

Northern blotting

 α -, β -, γ -ENaCのmRNAはそれぞれ2281 bp, 2745 bp, 2497 bpである¹⁶⁾. またRAK (Rana adult keratin)のmRNAは1700 bpである¹⁸⁾.

作成したRNA probeの特異性を調べるため、northern blot解析を行った(図1). α -、 β -ENaCとRAKのDIG標識RNA probeを用いたnorthern blot解析の結果、それぞれ目的の大きさの1本バンドが検出された. この結果は、本研究で用いた α -、 β -ENaCおよびRAKに対するprobeが、各遺伝子に特異的なprobeであることを示している. 我々は、 α -、 β -ENaCおよびRAKに対するprobeが信頼できると考え、 $in\ situ$ hybridization実験に用いた.

一方、y-ENaCのDIGラベルRNA probeではシグナルは検出できなかった. 我々は、y-ENaCに対する probeを数種作成したが、いずれもシグナルは検出できなかった (data not shown).

In situ hybridization

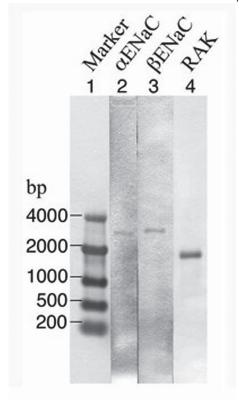
In situ hybridization法で成体ウシガエル皮膚の ENaC mRNAの局在を調べた(図2)。 α -ENaCのDIG 標識 RNA probeをhybridizeした結果,シグナルは,成体表皮の顆粒細胞だけでなく,有棘細胞,さらに一部ではあるが胚芽細胞からも検出された(図2A)。 β -ENaCのprobeを用いた結果では,hybridizationシグナルは,顆粒細胞と顆粒細胞に近い有棘細胞の一部から検出されたが,胚芽細胞では検出されなかった(図2C)。RAKのprobeを用いた結果は,Suzuki et al. ¹⁸の結果同様,成体皮膚の胚芽細胞に強いシグナルが検出され,細胞全体に染色が見られた(図2E)。一方, α -, β -ENaCの結果では,シグナルは核付近に集中していた(図2A,C)。角化細胞と真皮には非特異的シグナルのみが見られた.

我々は、y-ENaCについても数種のRNA probeを 用いて*in situ* hybridizationを試みたが、northern blot 解析の結果同様、特異的なシグナルは検出できな かった(data not shown). さらに我々は、同様の方法でウシガエル幼生皮膚におけるENaC mRNAの局在を調べた。しかしながら、幼生皮膚ではどの遺伝子のprobeを用いても非特異的シグナルが強くでたため、antisense probeの結果とsense probeの結果との比較から特異的なシグナルを検出することができなかった。従って、ウシガエル幼生皮膚におけるENaC mRNAの局在は α -、 β -、 γ -ENaCのいずれについても判定できなかった。

考察

本研究では*in situ* hybridizationを用いて成体と幼生ウシガエル皮膚におけるENaC mRNAの局在を調べた.

成体表皮において、 α -ENaC mRNAは顆粒細胞、有棘細胞、胚芽細胞に発現していた。 β -ENaC mRNAは顆粒細胞と有棘細胞に発現していた。 γ -ENaCについてはシグナルが検出されず、局在を判別できなかった。今回我々は、 γ -ENaCのRNA probeを数種作成したが、そのいずれもnorthen blot 解析及び *in situ* hybridizationで成体皮膚の γ -ENaC mRNAの存在を捉えることができなかった。 γ -ENaCに対する probe 作成のために選んだ配列部位や、長さに問題があったか、あるいは、成体皮膚に発現している γ -ENaC

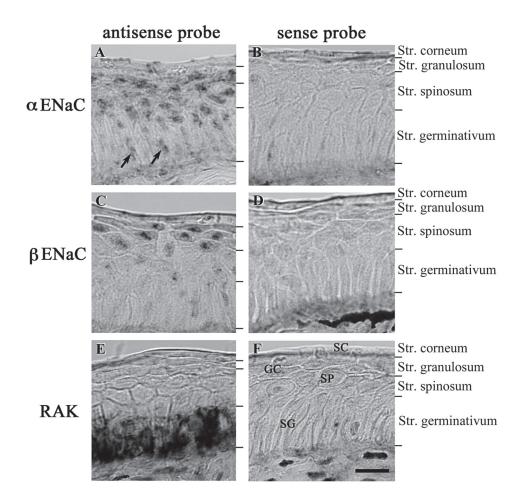


mRNAの量が、採用した実験手法で捉えるには少なすぎた可能性がある.

ENaCは表皮の頂側細胞の頂側細胞膜に局在していてはじめて上皮 Na 輸送に関与できる。それとともに、頂側細胞の頂側細胞膜に局在していれば他の細胞に発現している必要は無い。成体表皮においての最外層の角化細胞は最終分化をとげ死に至っている細胞である。顆粒細胞こそが生きて生体機能に役割をはたす頂側の最外層の細胞である。そこでENaC 蛋白は顆粒細胞に発現しその頂側に局在していれば十分である。Takada et al. 15 の免疫染色によれば、anti α -ENaC は顆粒細胞の頂側細胞膜に反応がみられた。それゆえ成体皮膚においてはENaC mRNAも顆粒細胞のみに局在していると予想していた。しかし、 $in\ situ\$ hybridization

法を用いた本研究で、 α -、 β -ENaCのmRNAは顆粒細胞にはもちろんのこと、有棘細胞にも発現していることが明らかになった。さらに、 α -ENaC mRNAは胚芽細胞にも発現していることが明らかになった。本研究は、成体皮膚においては、ENaC mRNAはENaC 蛋白の発現に先行し、細胞分化の早い時期から発現することを示した。また、この結果から、上皮 Na 輸送機能に無関係と思われる有棘細胞/胚芽細胞に発現しているENaC mRNAの役割は何か、という新しい疑問が提示された。

本研究の目的の一つは幼生皮膚におけるENaC mRNAの局在の解明であった。RT-PCRによる研究では幼生皮膚において α -, β -, γ -ENaCのmRNAのいずれも発現していた¹⁵⁾. しかし, *in situ* hybridization



では幼生皮膚において α -, β -, γ -ENaCのmRNAのいずれの発現も捉えられなかった。RT-PCRでは mRNAの存在を増幅して捉える。そこで mRNAの発現量が少なくても捉えることができた可能性がある。幼生皮膚において発現している α -, β -, γ -ENaC mRNAは in situ hybridizationでとらえるには少なすぎたのかもしれない。今後,少ない発現量の mRNAでも mRNAの存在をとらえることのできる新たな in situ hybridizationの方法を開発する必要がある。

anti α -ENaC は幼生表皮の頂側細胞であるアピカル細胞の細胞膜に反応した 15. それにも関わらず幼生では ENaC 機能 (amiloride-blockable response) が見られない 8-10,19. α -ENaC 蛋白がアピカル細胞の全周に局在することに問題があるのかもしれない. あるいは、幼生皮膚の α -ENaC 蛋白は修飾され (あるいは修飾を受けず),本来の機能が見られないのかも知れない. さらに anti α -ENaC が真に α -ENaC 蛋白と反応しているのではなく,幼生皮膚に存在する全く別の蛋白に反応し、それを α -ENaCの signal と誤解した可能性も残る. anti α -ENaCの反応する蛋白の実体を 2 次元泳動と Tof/MS 解析で研究する必要がある. これらの解明が ENaC 蛋白の局在調節の今後の検討課題となった.

今後の展開

我々はすでに上記方面の研究を開始した。研究にあたっては2次元泳動後,anti α -ENaCに反応したspotをgelから切り出し解析することになる。Gelのspot位置の信頼性を高めるため,泳動用のcontrolとしてENaC-HA (HA-tagの付いたENaC) を合成し,その泳動パターンと比較することにした。University of Southern IllinoisのDr. Jensikから,彼が作成した α -ENaC-HA constractの供与を受けた。Constructを大腸菌で大量合成し,HEK細胞にtransfectして α -ENaC-HAを合成させた。 α -ENaC-HAが合成されたかどうかはSDS-PAGE後western blottingし,anti α -ENaC とanti HAとで反応させて確認した。現在 α -ENaC-HAの2次元泳動にかかっているところである。

さらに、constructをEDTA処理した幼生皮膚に transfectすれば、constructは表皮幹細胞である基底 細胞にtransfectされることになる。それをcorticoid/cortidoid + PRLで培養すれば、成体皮膚/幼生皮膚を分化誘導した場合のENaC-HAの発現と局在の挙動の相違をより的確に捉えることができるはずである。この研究も開始した。

これら研究はDr. Jensikとの共同研究として進行中である。それとともにこの研究が次の学内グラント採択につながることを願っている。

なおENaC mRNAの*in situ* hybridizationの結果はActa Histochemicaに印刷中である²⁰⁾.

引用文献

- Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/ degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared stress. Physiol Rev 2002;82: 735-67.
- 2) Brouard M, Casasdo M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N. Epithelial sodium chanel in human epidermal kerationocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation. J Cell Sci 1999;112:3343-52.
- 3) Mauro T, Guitard M, Behne M, Oda Y, Crumrine D, Komuves L, Rassner U, Elias PM, Hummler E. The ENaC channel is required for normal epidermal differentiation. J Invest Dermat 2002;118:589-94.
- 4) Ishikawa T, Marunaka Y, Rotin D. Electrophysiological characterization of the rat epithelial Na⁺ channel (rENaC) expressed in MDCK cels: effects of Na⁺ Ca²⁺. J Gen Physiol 1998;111:825-46.
- 5) Kashlan OB, Sheng S, Kleyman TR. On the interaction between amiloride and its putative α -subunit epithelial Na⁺ channel binding site. J Biol Chem 2005;280:26206-15.
- 6) Whitear M. Epidermis. In: Bereiter-Hahn J, Matoltsy AG, Richards KS, editors. Biology of the integument 2. Berlin: Springer-Verlag; 1986. P. 8-38.
- 7) Robinson DH, Heinzerman MB. Morphology of ventral epidermis of *Rana catesbeiana* during metamorphosis. Anat Rec 1987;217:305-17.
- 8) Cox TC, Alvarado RH. Electrical and transport characteristics of skin of larval *Rana catesbeiana*. Am J Physiol 1979;237:R74-9.
- 9) Hillyard SD, Zeiske W, Van Driessche W. A fluctuation analysis study of the development of amiloride-sensitive Na⁺ transport in the skin of larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). Biochim Biophys Acta 1982;692:445-61.
- 10) Takada M. Differentiation of the active sodium transport system during metamorphosis in *Rana catesbeiana* skin in relation to cadmiumand amiloride-induced responses. Jpn J Physiol 1985;35:525-34.
- 11) Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta Physiol Scand 1951;23:110-27.
- 12) Takada M, Yai H, Takayama-Arita K. Corticoidinduced differentiation of amiloride-blockable active Na⁺ transport across larval bullfrog skin in vitro.

- Am J Physiol Cell Physiol 1995;268:C218-26.
- 13) Takada M, Yai H, Takayama-Arita K, Komazaki S. Prolactin enables normal development of AChstimulated current in cultured larval bullfrog skin. Am J Physiol 1996;271:C1059-63.
- 14) Takada M, Kasai M. Growth hormone is a weaker candidate than prolactin for the hormone responsible for the development of a larval-type feature in cultured bullfrog skin. J Exp Biol 2003;206:1137-41.
- 15) Takada M, Shimomura T, Hokari S, Jensik PJ, Cox TC. Larval bullfrog skin expresses ENaC despite having no amiloride-blockable transepithelial Na⁺ transport. J Comp Physiol B 2006;176:287-93.
- 16) Jensik PJ, Holbird D, Cox TC. Cloned bullfrog skin sodium (fENaC) and xENaC subunits hybridize to form functional sodium channels. J Comp Physiol B 2002;172:569-76.
- 17) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-9.
- 18) Suzuki K, Sato K, Katsu K, Hayashita H, Kristensen DB, Yoshizato K. Novel *Rana* keratin

- genes and their expression during larval to adult epidermal conversion in bullfrog tadpoles. Differentiation 2001;68:44-54.
- 19) Takada M, Yai H, Komazaki S. In vitro treatment of bullfrog tadpoles with aldosterone potentiates Achreceptor channels, but not amiloride-blockable Na⁺ channels in the skin. Zool Sci 1997;14:883-6.
- 20) Kaneko Y, Fujimaki-Aoba K, Watanabe S, Hokari S, Takada M. Localization of ENaC subunit mRNAs in adult bullfrog skin. Acta Histochemica 2011 (in press) (DOI:10.1016/j.acthis.2011.02.008).

研究成果リスト

学会発表

Kaneko Y, Fujimaki-Aoba K, Watanabe S, Hokari S, Takada M. Expression pattern of ENaC mRNAs in adult bullfrog skin, 第 32 回日本分子生物学会年会,平成 21 年 12 月,横浜

論文

<u>Kaneko Y, Fujimaki-Aoba K, Watanabe S, Hokari S, Takada M.</u> Localization of ENaC subunit mRNAs in adult bullfrog skin. Acta Histochemica 2011 (in press)