

博士論文

腎臓における ERM タンパク質の生理的役割に

関する研究

**(Physiological roles of ERM protein on
the kidney)**

2019 年 3 月

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

川口 高德

立命館大学審査博士論文

腎臓における ERM タンパク質の生理的役割に
関する研究

**(Physiological roles of ERM protein on
the kidney)**

2019 年 3 月

March 2019

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

**Doctoral Program in Pharmacy
Graduate School of Pharmacy
Ritsumeikan University**

川口 高德

KAWAGUCHI Kotoku

研究指導教員：浅野 真司 教授

Supervisor: Professor ASANO Shinji

【目次】

緒言	1
方法	5
第一部 糸球体における ERM タンパク質の役割	
背景	15
結果	19
考察	24
第二部 尿細管における ERM タンパク質の役割	
背景	29
結果	33
考察	38
結語	43
謝辞	45
参考文献	46
図表	55

【緒言】

Ezrin, Radixin, Moesin からなる ERM タンパク質は、Actin 細胞骨格と、細胞膜タンパク質または足場タンパク質とを架橋する機能を有する細胞骨格関連タンパク質である¹⁾。ERM タンパク質は N 末端側に存在する約 300 アミノ酸からなる膜結合ドメイン、約 200 アミノ酸からなる α ヘリックスドメイン、そして C 末端側に存在する約 100 アミノ酸からなる正電荷を帯びたドメインから構成される^{2,3)}。このうち、N 末端領域の膜結合ドメインは Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin (FERM) ドメインと呼ばれ、ファミリー間で約 85% という非常に高いアミノ酸相同性をもつ。FERM ドメインには、膜輸送タンパク質である Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter 2 (NKCC2) および Na^+ , H^+ -exchanger 1 (NHE1) や、接着タンパク質である CD44、細胞間接着分子である ICAM-2 のほか、膜リン脂質である phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) などの分子が結合することが報告されている。また、足場タンパク質である Na^+ , H^+ -exchanger regulatory factor (NHERF) を介して、糸球体足細胞においてタンパク質ろ過障壁を構成する Podocalyxin や、リン酸輸送体である Na^+ -dependent phosphate transporter 2A (Npt2a)、クロライドチャネルである Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) と複合体を形成して機能調節すると考えられている³⁻⁵⁾。一方、ERM タンパク質の C 末端側の正電荷を帯びたドメインでは、Actin 細胞骨格と結合する (Fig. 1)。このように、ERM タンパク質は、N 末端側で膜タンパク質や膜リン脂質と、C 末端側でアクチン細胞骨格と結合して、両者をクロスリンクし、タンパク質の膜発現を安定化する働きをもつと考えられている (Fig. 2)²⁾。

また、ERM タンパク質は、低分子量 GTPase の一種である Rho GTPase の制御因子としての機能も報告されている。ERM タンパク質は、Rho GDP/GTP 交換タンパク質である Dbl と結合し、Rho GTPase の活性化を促すことが報告されている。また、Rho GTPase の阻害調節因子である Rho-GDP-dissociation inhibitor (Rho

GDI) と FERM ドメインで相互作用し、Rho GTPase の Rho-GDI からの解離を促進することで Rho GTPase を活性化する働きをもつ (Fig. 3)^{2,6)}。このような ERM タンパク質による Rho GTPase の制御は、Rho GTPase のシグナルによる細胞骨格構成の調節に関与していると考えられている。

ERM タンパク質は全身に発現しているが、Ezrin、Radixin、Moesin それぞれのタンパク質は臓器や細胞によって異なる発現分布をとっている。Ezrin は主に胃壁細胞、腸細胞および近位尿細管細胞などの上皮細胞に発現する。Ezrin の発現を野生型の 5%以下にまで抑制した Ezrin ノックダウン (*Vil2^{kd/kd}*) マウスは、胃壁細胞において H⁺,K⁺-ATPase が発現する細管小胞とアピカル膜との膜融合障害による無酸症の発症が引き起こされることが明らかとなっている⁷⁾。Radixin は肝臓の毛細胆管細胞や近位尿細管細胞に発現している。Radixin ノックアウト (*Rdx^{-/-}*) マウスは毛細胆管のアピカル膜での multi-drug resistant protein 2 (MRP2) の発現が低下することで基質であるビリルビンの胆汁中への排泄が障害され、高ビリルビン血症を呈することが報告されている⁸⁾。Moesin は、マクロファージ、リンパ球や好中球などの血液細胞や、血管内皮細胞、肺、腎臓の上皮細胞などに発現する。Moesin ノックアウト (*Msn^{-/-}*) マウスは細菌感染時における T 細胞および B 細胞のリンパ器官からの浸潤の低下が見られることや⁹⁾、Rho GTPase の阻害による好中球の走化性に異常が確認されている¹⁰⁾。

腎臓では、すべての ERM タンパク質の発現が見られるが、その発現部位は異なっている。Ezrin は糸球体足細胞および近位尿細管に、Radixin は近位尿細管および内皮細胞に、Moesin は近位尿細管、ヘンレの太い上行脚 (TAL) および内皮細胞に発現が見られる (Fig. 4)。 *Vil2^{kd/kd}* マウスは野生型マウスと比較して、近位尿細管のアピカル膜に発現するリン酸輸送体 Npt2a の細胞膜上での発現が低下することで尿中へのリン酸排泄の増加および血中リン酸濃度の低下を呈しており、十二指腸におけるビタミン D 依存性 Ca²⁺チャネル Transient receptor potential vanilloid 6 (TRPV6) の刷子縁膜での発現低下と合わせて、骨形成に重要なリン酸やカルシウムのバランスの異常が成長遅延に関与することが示唆されている¹¹⁾。 Moesin については、近位尿細管において Moesin が片側尿管結紮モデルラットに

において上皮間葉転換および尿細管間質性線維症の進展に関与していることが示唆されている¹²⁾。しかし、腎臓におけるERMタンパク質の生理的な機能についての知見は乏しく、更なる研究が必要であると考えられる。

腎臓はネフロンと呼ばれる構造単位からなる。ヒトの腎臓は約100万個のネフロンからなり、体液の恒常性を維持する重要な役割を担う。ネフロンは、血液を限外ろ過して原尿を生成する糸球体と、アピカル膜に発現する膜輸送タンパク質によって原尿から電解質や水分を再吸収して体液調節を行う尿細管から構成されている。Na⁺については、近位尿細管で約65%、TALで25-30%、遠位尿細管で約5%が、原尿中から再吸収されると考えられている (Fig. 5)。糸球体ろ過や尿細管再吸収は、細胞膜上に発現する種々の膜タンパク質によって担われている。

糸球体の中でも、足細胞は特に糸球体タンパク質ろ過障壁としての機能を担う上で重要であると考えられている。足細胞は、足突起を伸ばして毛細血管の周りを覆い、基底膜と共にろ過機能を構成する働きを持つ。Ezrinは糸球体足細胞に豊富に発現し、NHERF2との相互作用を介してシアル酸タンパク質の1つであるPodocalyxinと複合体を形成する⁴⁾。しかし、Ezrinの糸球体で果たす役割は解明されていない。そこで、第一部では、*Vil2^{kd/kd}*マウスを用いて、糸球体足細胞でのEzrinの糸球体の機能および形態における役割について解析を行った。

一方、尿細管TALでは糸球体ろ過を受けて原尿中に排泄された電解質を、アピカル膜に局在するNKCC2によって再吸収することで、体液中の電解質バランスを適正に保っている。MoesinはTALにおいて発現し、NKCC2と複合体を形成することが報告された。ブタ腎尿細管細胞であるLLC-PK1細胞を用いた実験では、Moesinの発現抑制がcNKCC2(NKCC1/NKCC2のキメラ体)のエキソサイトシスを抑制して、細胞膜上での発現が低下することを示している¹³⁾。しかし、Moesinの電解質輸送における役割や、Moesin欠損時の電解質動態異常に関わる病態の報告はない。そこで、第二部では、*Msn^{-/-}*マウスを用いて、Moesin欠損時のTALでの電解質再吸収異常に関わる表現系を解析し、NKCC2の細胞膜上での発現変化を解析することでTALにおけるMoesinの生理的役割について

検討した。

【方法】

実験動物

8-11 週齢の雄の野生型および *Vil2*^{kd/kd} マウス、*Msn*^{-/-} マウスを用いた。*Vil2*^{kd/kd} マウスは、Ezrin をコードする遺伝子のエクソン 2 および 3 間のイントロン領域に En2 (Homeobox protein engrailed-2)、SA (splicing acceptor)、IRES (Internal ribosome entry site)、lacZ、neo (neomycin-resistance gene)、PA (polyadenyl site) を含む変異カセットを挿入し、野生型マウスと比較して Ezrin の発現が 5%以下に抑制されたマウスとして作出された⁷⁾。*Msn*^{-/-} マウスは、X 染色体上に存在する Moesin をコードする遺伝子のエクソン 3 の 3'部を欠損させるため、loxP/ホスホグリセリン酸キナーゼ-neo/loxP カセットおよび SA/PA を含む変異カセットを挿入し、Moesin の発現を完全に欠損させた¹⁴⁾。大阪大学大学院生命機能研究科個体機能学講座の月田早智子教授よりご供与いただいたこれらの遺伝子改変マウスの雄と C57BL/6J Jcl の雌の体外受精卵を親マウスとなる ICR マウスに着床させ、出生したマウスを繁殖させて実験に使用した。

マウスは室温を一定に管理し、照明が 12 時間ごとに点灯・消灯する施設で、自由飲水、自由食餌の状態に飼育した。本研究で行ったすべての動物実験に関しては、立命館大学動物実験委員会による審査、立命館大学学長の承認を受け、実験指針や規定を遵守して実施した。

ジェノタイピング

マウスの尾を約 3 mm 切断し、50 mM 水酸化ナトリウム溶液を加えた後、95°C で 10 分間熱処理を行った。続いて、1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加えてボルテックスミキサーを用いて 5 秒間混和した後、室温で 12,000 rpm、20 分間遠心分離し、上清を PCR の鋳型として使用した。PCR には、耐熱性 DNA ポリメラーゼとして KOD FX (TOYOBO)を用いた。また、*Vil2*^{kd/kd} マウス、*Msn*^{-/-} マウスでそれぞれで用いた特異的 primer については Table 1 に示した。反応液量は 10 μ L で、PCR のサイクル条件は、3 step (95°C、30 秒 ; 65°C、30 秒; 72°C、1 分)、35 サイクル

で行った。PCRの結果、*Vil2^{kd/kd}* マウス用の primer では野生型アレルとして 380 bp、Ezrin ノックダウンアレルとして 290 bp、*Msn^{-/-}* マウス用の primer では野生型アレルとして 450 bp、Moesin ノックアウトアレルでは 280 bp の増幅産物が得られることから、アガロース電気泳動によって遺伝子型を確認した。

組織の固定および切片作製

マウスを開腹後、右心房を切開し、左心室より翼状針 (TERUMO) を用いてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で灌流した。腎臓を切り出し、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて 1 日間 4°C で固定した。その後、パラフィンに包埋し、半自動回転マイクロトーム (RM2245、Leica) にて 4 μm の厚さに薄切し、スライドガラス (松浪硝子工業) に貼り付けパラフィン切片を作製した。

免疫蛍光染色

パラフィン包埋されたマウス腎組織切片を脱パラフィン処理した後、水洗した。続いて、0.01 M クエン酸緩衝液に浸透し、121°C で 20 分間オートクレーブ処理することで抗原の賦活化を行った。その後、PBS ですすいだ後、一次抗体 (Table 2) を 4°C で一晩反応させた。その後、0.1% Tween 20 を含む PBS-T で洗浄し、二次抗体 (Alexa Fluor 488 標識抗マウス抗体、Alexa Fluor 594 標識抗ウサギ抗体、Alexa Fluor 633 標識抗ヤギ抗体) を用いて室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、蛍光染色用の Mounting Medium (VECTASHIELD、Vector Laboratories) を用いて封入し、共焦点顕微鏡 (FV-1000D IX-81、Olympus) を用いて観察を行った。

ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色

パラフィン包埋されたマウス腎組織切片を脱パラフィン処理した後、水洗し、ギルヘマトキシリン溶液 (CS-4022、ファルマ) で 5 分間染色した。その後、20 分間水洗し、エオジン溶液 (Sigma) で 1 分間染色した。再度軽く水洗した後、

エタノールで脱水処理、キシレンで透徹処理を行い、非水性封入剤 (Merck) を用いて封入し、観察を行った。

電子顕微鏡観察

切り出したマウス腎臓を 2%パラホルムアルデヒドと 2%グルタルアルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて 1 日間 4°C で固定した。その後、0.1 M リン酸緩衝液ですすぎ、2%四酸化オスミウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液を用いて 4°C で後固定した。エタノールを用いて脱水し、酸化プロピレンに置換した後、70: 30 酸化プロピレン・レジン (Quetol 812、日新 EM) 混合物中で 1 時間静置した。その後、100%レジンを置換し、60°C で 48 時間熱重合させることで包埋した。作製した包埋ブロックを 70 nm の厚さで超薄切し、グリッドに乗せた後、2%酢酸ウラニルに浸し 15 分間室温で染色した。水洗後、lead stain solution (Sigma) を用いて 3 分間室温で二次染色を行った後、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX、JEOL) を用いて観察した。

組織からのタンパク質抽出

切り出したマウス腎臓を皮質部と髄質部に切り分け、Lysis buffer (150 mM NaCl、3 mM KCl、5 mM EDTA、3 mM EGTA、0.1% Triton X-100、60 mM HEPES) を加え、ポリトロンホモジナイザー (KINEMATICA) を用いてホモジナイズした。それぞれのホモジネートを 4°C、800×g で 5 min 遠心分離し、その上清を Total tissue lysate とした。

糸球体の単離

遠位腹部大動脈、遠位下大静脈、上腸間膜動脈、腹腔動脈および近位腹部大動脈を結紮後、腎臓を 20 mL の氷冷した PBS を用いて灌流した。その後、PBS 中に 2×10^6 個/mL の濃度で Dynabeads M-450 Tosylactivated (Veritas) を含む懸濁液で腎臓を再度灌流した。腎臓を切り出し、ミンスした後、1 mg/mL Collagenase (Sigma) を含む PBS を用いて 37°C で 30 分間消化した。その後、100 μ m および

70 μm の細胞ろ過フィルター (BD Biosciences) を用いてろ過し、Dynabeads を含む糸球体を Magnetic particle concentrator (DYNAL BIOTECH) を用いて回収した。

タンパク定量

ウシ血清アルブミンを標準試料として検量線を作製し、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) を用いて定量した。

ウェスタンブロッティング

得られたタンパク質試料に SDS サンプルバッファー (2% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)、2% 2-mercaptoethanol、20% glycerol、0.01% Bromophenol Blue (BPB)、50 mM Tris-HCl (pH 6.8)) を加え、65°C で 15 分間熱処理した。続いて、Laemmli の手法による SDS-PAGE (分離ゲル濃度 8-12.5%) でタンパク質を分離した後に Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写し、5% スキムミルクを含む TBS-T を用いて室温で 1 時間ブロッキング処理を行った。一次抗体 (Table 2) を 4°C で一晩反応させた後、二次抗体を用いて室温で 1 時間反応させた。Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) で化学発光させ、LAS-4000mini (Fujifilm) で検出した。検出結果の定量的評価については、画像解析ソフトウェア ImageJ を用いた。

糸球体障害モデルの作製

Adriamycin (ADR) 投与モデルでは、マウスに 50 mg/kg body weight の ADR (Wako Purechemical) を単回で静脈内投与した。その 7 日後にスポット尿を採取し、マウスを解剖して腎臓および全血を採取した。Lipopolysaccharide (LPS) 投与モデルでは、200 μg の LPS (*Escherichia coli* O111:B4 strain 由来、Invivogen) を腹腔内投与し、その 24 時間後にスポット尿、腎臓および全血を採取した。スポット尿は採取後、室温、3,000 \times g で 15 分間遠心分離し、上清を尿試料とした。全血はその後、4°C、1,000 \times g で 15 分間遠心分離した後上清を回収、血漿試料とした。

Rho 活性の測定

糸球体における RhoA、Rac1 および Cdc42 の活性を、G-LISA activation assay (Cytoskeleton) を用いて測定した。単離した糸球体を氷冷した G-LISA Cell Lysis Buffer を用いて溶解し、4°C、3,000×g で 15 分間遠心分離を行った。回収した上清を、Rho-GTP affinity G-LISA plate に加え、室温で 30 分間インキュベートした。その後、RhoA、Rac1 および Cdc42 の活性化型である GTP 結合型の存在量を、それぞれの検出抗体を反応させた後、検出用発色試薬を加えて 490 nm の波長で比色定量を行った。

血漿および尿における生化学的分析

代謝ケージによる解析の最終日にマウスの心臓右心室に 27G のインスリン用注射針 (TERUMO) で穿刺して全血を採取し、4°C、1,000×g で 15 分間遠心分離した後上清を回収、血漿試料とした。同日にスポット尿の採取を行い、室温、3,000×g で 15 分間遠心分離し、上清を尿試料とした。得られた血漿試料と尿試料に対し、富士 DRI-CHEM 4000i (Fujifilm) を用いて Na⁺、K⁺、Cl⁻について電極法、クレアチニンについて比色法による濃度測定を行った。尿中への Na⁺、K⁺、Cl⁻の総排泄量 (ENa、EK、ECI) および分画排泄率 (FENa、FEK、FECl) は、これらの測定結果より以下の方法で算出した。

$$\text{ENa } (\mu\text{mol}/100 \text{ g BW}/\text{day}) = U_{\text{Na}} (\mu\text{M}) \times V (\text{L}/\text{day}) \times 100 / \text{BW} (\text{g})$$

$$\text{FENa } (\%) = (U_{\text{Na}} (\text{mM}) / P_{\text{Na}} (\text{mM})) / (U_{\text{Cr}} (\text{mg}/\text{dL}) / P_{\text{Cr}} (\text{mg}/\text{dL})) \times 100$$

ただし、V: 1 日尿量、BW: 体重、U_{Na}: 尿中 Na⁺濃度、P_{Na}: 血漿中 Na⁺濃度、U_{Cr}: 尿中クレアチニン濃度、P_{Cr}: 血漿中クレアチニン濃度を表す。

また、血液中の HCO₃⁻濃度および pH については血液ガス分析装置 (ABL555、Radiometer) を用いて測定した。

糸球体ろ過量 (glomerular filtration rate: GFR) の測定

GFR は fluorescein isothiocyanate (FITC)-inulin ボーラス投与方法によって測定した。尾静脈より FITC-inulin (Sigma) を単回静脈内投与し、その 3、10、15、35、

75、100 および 120 分後に血液を回収した後、血中 FITC-inulin 残存量を蛍光強度より測定した。その後、血液から組織への分布相と腎臓からの尿中消失相を仮定した 2-コンパートモデルを用いて GFR の算出を行った (Graph Pad software、GraphPad Prism)。

TAL 尿細管懸濁液の調製

マウスを開腹後、右心房を切開し、左心室より翼状針を用いて腎臓を HEPES 緩衝溶液 (130 mM NaCl、2.5 mM NaH₂PO₄、4 mM KCl、1.2 mM MgSO₄、6 mM L-alanine、1 mM Na citrate、5.5 mM glucose、2 mM CaCl₂、10 mM HEPES (pH 7.4)) で灌流し、外髄質を切り出した。ミンスした後、1 mg/mL Collagenase を含む HEPES 緩衝溶液中で 37°C、30 分間インキュベートした。その後、スピンドウンして、氷冷した HEPES 緩衝溶液に懸濁し、200 μm のナイロンメッシュフィルターでろ過し、氷冷した HEPES 緩衝溶液に懸濁した。

ビオチン化標識による細胞膜上でのタンパク質発現量解析

調製した TAL 尿細管懸濁液に対し、1.2 mg/mL Sulfo-NHS-SS-ビオチンを含む HEPES 緩衝溶液 (L-alanine および Na citrate を除く) 中で 4°C、30 分間インキュベートした。続いて、100 mM の glycine を用いて過剰な Sulfo-NHS-SS-ビオチンをクエンチした。HEPES 緩衝溶液で洗浄した後に、Lysis buffer (150 mM NaCl、5 mM EDTA、1% Triton X-100、0.1% SDS、50 mM HEPES (pH 7.5)、protease inhibitor cocktail (cOmplete、Roche)) で溶解した。サンプル間でタンパク質量を 200 μg に合わせ、Streptavidin-coated agarose beads (Sigma) に加えて 4°C で一晩インキュベートした。その後、wash buffer (150 mM NaCl、5 mM EDTA、0.1% Triton X-100、50 mM HEPES (pH 7.5)) で 2 回洗浄し、50 mM の dithiothreitol (DTT) および 10% の 2-mercaptoethanol を含む SDS サンプルバッファー中で 65°C、15 分間加熱し、beads から結合したタンパク質を溶出した。得られたタンパク質溶出液を、ウェスタンブロットティングにより解析した。

NKCC2 の内部移行解析

調製した TAL 尿細管懸濁液に対しビオチン化標識した後に、37°Cで 0、30、60 分間とインキュベーションすることで NKCC2 のエンドサイトーシスを引き起こした。時間経過後直ちに氷冷した PBS を加え、50 mM Sodium 2-mercaptoethane sulfonate (MESNa) で処理した。過剰量の MESNa をクエンチするために、25 mM iodoacetamide を加えて 4°Cで 15 分間インキュベートした。その後、サンプル間でタンパク質量を 500 μ g に合わせ、Streptavidin-coated agarose beads (Sigma) に加えて 4°Cで一晩インキュベートした。続いて、50 mM の DTT および 10%の 2-mercaptoethanol を含む SDS サンプルバッファーで溶出し、得られたタンパク質溶出液を、ウェスタンブロッティングにより解析した。

密度勾配遠心法による細胞内小胞画分の発現解析

腎臓を灌流後、外髄質を切り出し、homogenization buffer (120 mM NaCl、20 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、protease inhibitor cocktail) を用いてホモジナイズした。その後、20,000 \times g、4°Cで 20 分間遠心分離した。上清を分取し、サンプル間でタンパク質量 500 μ g、容量 1 mL に合わせ、OptiPrep (Axis Shield) で作製した 8-34%の連続勾配 (10 mL) 上に重層した。OptiPrep の連続勾配は、Gradient Master (SK-bio) を用いて作製した。その後、スウィングローター (P40ST、日立) を用いて、4°C、100,000 \times g で 18 時間遠心分離した。遠心後、1 mL ごとに上層から回収し、2 倍量の氷冷した acetone を加えて、-30°Cで一晩静置した。翌日、4°C、10,000 \times g で 15 分間遠心分離し、ペレットを風乾した。100 μ L の SDS サンプルバッファーで溶解し、ウェスタンブロッティングにより解析した。

脂質ラフト画分の発現解析

腎臓を灌流後、髄質を切り出し、fractionation buffer (10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM EDTA、1 mM EGTA、250 mM sucrose、1 mM DTT、20 mM HEPES (pH 7.4)、protease inhibitor cocktail) を用いてホモジナイズした。その後、27 G の注射針を

10 回通過させ、氷上に 20 分間静置した。4°C、10,000×g で 5 分間遠心分離し、上清を 4°C、100,000×g で 1 時間超遠心した。ペレットを fractionation buffer で洗浄した後に、TN buffer (150 mM NaCl、5 mM EDTA、1% Triton X-100、1 mM DTT、25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、protease inhibitor cocktail) で再懸濁した。サンプル間でタンパク質量 500 µg、容量 1 mL に合わせた後に、2 倍量の OptiPrep (60%) と混合し、OptiPrep 濃度が 40%となる試料溶液を調製した。続いて OptiPrep を希釈して 35%、30%、25%、15%の濃度に調製し、スウィングローター用チューブに 40% (試料溶液)、35%、30%、25%、15%の順で、3 mL、2 mL、2 mL、2 mL、2 mL ずつ重層した。P40ST ローターを用いて 4°C、170,000×g で 15 時間遠心分離し、上から 1 mL ずつ分取した。各画分に 2 倍量の氷冷した acetone を加えて、-30°Cで一晩静置し、4°C、10,000×g で 15 分間遠心分離した。ペレットを風乾して 100 µL の SDS サンプルバッファーで溶解後、ウェスタンブロッティングにより解析した。

NKCC2 の活性測定

TAL における NKCC2 の活性を測定するために、FluxOR Thallium detection kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。調製した TAL 尿細管懸濁液 kit に添付の FluxOR Dye loading buffer を用いて 37°Cで 1 時間インキュベートし、 Tl^+ 感受性の蛍光インジケーター色素である FluxOR を取り込ませた。2.7 mM probenecid および 100 µM ouabain を含む FluxOR assay buffer (135 mM Na-gluconate、1 mM $MgCl_2$ 、1 mM Na_2SO_4 、1 mM $CaCl_2$ 、15 mM HEPES (pH 7.4)) で 2 回洗浄後、100 µM のフロセミドを含有および非含有の FluxOR assay buffer それぞれで室温、30 分間インキュベートした。その後、37°Cに事前に加温しておいた 100 µM フロセミド含有または非含有の Tl^+ uptake buffer (135 mM NaCl、5 mM Tl_2SO_4 、100 µM Ouabain、20 mM HEPES (pH 7.4)) に再懸濁し、37°Cで 5 分間 Tl^+ を取り込ませた後、等量の氷冷した FluxOR assay buffer を加えて反応を停止した。2 回洗浄後、Lysis buffer で溶解し、マイクロプレートリーダー (SH-8100Lab、Corona Electric) を用いて励起波長 490 nm、蛍光波長 520 nm で FluxOR dye の蛍光強度を測定した。結果

より、タンパク質量あたりのフロセミド感受性の TI^+ の取り込み量から、NKCC2 の輸送活性を評価した。

マウス水負荷モデルの作製

水負荷モデルでは飲料水を 3% sucrose 水溶液に変更し、7 日間飼育後にマウスを解剖し、腎臓を切り出した。その後、採取した腎臓に対して、ビオチン化標識を用いた細胞膜上でのタンパク質の発現解析を行った。

組織からの RNA 抽出

切り出したマウス腎臓を、皮質部と髄質部に切り分けた後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、RNA の抽出を行った。RNeasy Mini Kit 添付の Buffer RLT に 1% (v/v) の 2-mercaptoethanol を添加した後、組織サンプルに対して 600 μL 加えてポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。その後、室温 16,000 $\times g$ で 3 分間遠心分離し、上清に同量の 70%エタノールを加えた。続いて、RNeasy スピンカラムに加え、室温 8,000 $\times g$ で 15 秒間遠心分離した。素通り画分を廃棄して Buffer RW1 を加え、室温 8,000 $\times g$ で 15 秒間遠心分離した。その後、Buffer RPE による洗浄を 2 回行い、RNA を RNase free 水に溶出した。NanoDrop 2000 (Thermo) を用いて、260 nm の吸光度を測定し、RNA 濃度を算出した。

逆転写反応

逆転写反応は Omniscript Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて行った。最終的に、鋳型 RNA は 20 μL 中に 2 μg 含まれるように調整し、Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いて 37°C で 1 時間反応させた。

Quantitative Real-time PCR 解析

mRNA の定量は、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて行った。逆転写反応で得られた cDNA サンプルを 20 倍希釈し、マウス Cyclooxygenase-2 (COX-2) および Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の特異的なプライマー

を用いて ABI PRISM7000 (Applied Biosystems) により PCR を行うことで、増幅曲線より Ct 値を算出し、定量評価した。GAPDH は遺伝子産物量の標準化に用いた。

統計解析

結果は平均 ± 標準誤差として示した。統計解析について、2 群間の比較は Student T test により検定した。また、多群間では Turkey's post-hoc test を用いた one-way ANOVA により検定した。 $p < 0.05$ の場合を有意とした。

第一部

糸球体における ERM タンパク質の役割

【背景】

糸球体は、血液中の老廃物や異物を尿中に排泄するためのろ過機能を担っており、その機能異常は腎不全など重篤な疾患に繋がる。糸球体は毛細血管がまとまった構造をとることで、このろ過機能を実現している。糸球体毛細血管は内皮細胞を有し、70-100 nm の無数の孔をもつ有窓構造をとっている。この有窓構造が毛細血管表面積の 20-50% を占めることで、血漿成分を透過させている¹⁵⁾。糸球体毛細血管は内皮細胞の他に、内皮細胞による構造を支持するメサンギウム細胞からなる。内皮細胞とメサンギウム細胞に対して、外側から糸球体基底膜、さらに足細胞が取り囲むことで、糸球体が構成されている。糸球体基底膜は両端で内皮細胞と足細胞に接しており、糸球体の構造的基礎を形成している。足細胞は高度に分化した上皮細胞で、内皮細胞と糸球体基底膜を外側から覆い、血中タンパク質の最終的なろ過障壁の機能を果たしている。毛細血管中を通る血液は、メサンギウム細胞に接する部分を除いて、これら内皮細胞、糸球体基底膜、足細胞によって作り出されたろ過障壁を介してボウマン嚢側に面している¹⁶⁾ (Fig. 6)。慢性腎不全に進行する症例の約 80% は、糸球体の機能障害によるこのようなタンパク質ろ過障壁の異常に関連しており、臨床的には最終的に透析や腎移植といった腎代替療法のような対応が必要となる¹⁷⁾。そのため、タンパク漏出性の腎疾患における治療法の開発につながる糸球体でのタンパク質ろ過障壁の分子機構を解明することは重要である。

糸球体において、内皮細胞は、その有窓性からタンパク質ろ過機構においてあまり重要な役割をもつとは考えられていないが、細胞表層に存在する負電荷を帯びたグリコサミノグリカンや膜結合プロテオグリカンが発現しており、電荷によるタンパク質ろ過障壁として機能することが報告されている。

糸球体基底膜においては、主成分の1つであるIV型 collagen の遺伝的変異が血尿や進行性の腎疾患を呈する Alport's 症候群を引き起こすことが知られている。しかし、Alport's 症候群では軽度のタンパク尿しか認められず、基底膜のタンパク質ろ過障壁としての役割は小さいと考えられている¹⁶⁾。

足細胞は、細胞体から伸び出した足突起が作るスリット膜 (slit diaphragm) と呼ばれるろ過障壁を形成し、糸球体毛細血管からボウマン嚢へのタンパク質漏出を防いでいる。足細胞は細胞体から太い一次突起を伸張させ、一次突起からさらに微小管および Actin 細胞骨格によってそれぞれ支持される二次および三次突起に枝分かれすることで、足突起を形成する。この足突起は、隣り合う足細胞の足突起との間で、アルブミンよりも小さい細孔を形成する規則的な噛み合わせを作っている。足突起間に構成されたスリット膜は、血液濾過の最終バリアーとして働き、糸球体ろ過障壁の主要な構成要素となる¹⁸⁾。ゼブラフィッシュの前腎における二光子顕微鏡を利用した経時的なライブイメージングでは、足細胞はほとんど移動せず、一次突起についても23時間突起の分岐パターンに変化を示さないなど、正常な足細胞は静止した細胞であることが示されている¹⁹⁾。しかし、片側尿管結紮や Adriamycin (ADR) を用いた糸球体障害モデルによる足細胞の傷害時、*in vivo* において連続多光子顕微鏡法を用いて観察すると動的な足細胞運動があることが報告されている²⁰⁾。これらの観察から、葉状仮足の伸張や接着のターンオーバーを誘導するシグナルが、足突起の退縮や移動を引き起こすことで足細胞足突起の病態に関わることが示唆されている。

足細胞の細胞膜には、スリット構造の形成に関わるタンパク質や、基底膜、アピカル膜それぞれに特異的に発現するタンパク質によって、タンパクろ過機構が構成されていることが明らかとなっている。足突起の基底近傍においてスリット構造の形成に関わるタンパク質として、細胞接着分子で、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通タンパク質 Nephritin が最初に発見された^{21,22)}。その後もネフローゼ症候群に関連する原因遺伝子の多くが足細胞に特異的に発現するタンパク質をコードしていたことから、現在では、糸球体タンパクろ過機構は主に足細胞が担っていると考えられている。Nephritin の他にも、スリット膜

の形成には足突起の細胞膜近傍におけるタンパク質複合体が重要であることが明らかとなっている。染色体劣性遺伝の家族性ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の原因遺伝子 *NPHS2* がコードするタンパク質である Podocin は²³⁾、足突起のスリット膜近傍に局在する膜貫通タンパク質である²⁴⁾。C 末端領域でリンカータンパク質として知られる CD2-associated protein (CD2AP) と相互作用し、CD2AP と複合体を形成する Nephrin のスリット膜への局在に必要であると考えられている²⁵⁾ (Fig. 6)。CD2AP は Nephrin との結合と、Actin 細胞骨格との相互作用を介して Nephrin の繫留に働くと考えられている²⁶⁾。その後、Nephrin と同様に IgG-like ドメインを持つ 1 回膜貫通型の膜タンパク質である Neph1 が発見され、Nephrin と同様にスリット膜の形成およびタンパク質ろ過機構において重要な働きをもつことが示唆されている²⁷⁾ (Fig. 6)。

足細胞の基底膜側では、他の上皮細胞と同様に、Integrin、Tetraspanin および Dystroglycan などの膜貫通細胞受容体が発現していることが知られている。Integrin は細胞ごとに異なるアイソフォームによる $\alpha\beta$ ヘテロダイマーを形成するタンパク質であり、足細胞においては $\alpha3\beta1$ Integrin が最も豊富に発現している²⁸⁾。Tetraspanin ファミリーの 1 つである CD151 は、足突起の基底に局在して $\alpha3\beta1$ Integrin と会合している²⁹⁾。Dystroglycan は足突起の基底膜上に局在しており、Actin 細胞骨格と結合していることが知られている³⁰⁾ (Fig. 6)。

一方、足細胞足突起のアピカル膜の主要なタンパク質は Podocalyxin である。Podocalyxin は、O-グリコシル化およびシアル化を受けた 1 回膜貫通型のタンパク質であり、足細胞アピカル膜において負電荷をもたらす分子である³¹⁾。Podocalyxin ノックアウトマウスでは、足突起およびスリット膜の消失が見られることで糸球体ろ過に異常をきたし、正常な尿生成を行うことができず、出生後 24 時間以内に急性腎不全により死亡することが報告されている³²⁾。このように、Podocalyxin は足細胞において足突起やスリット膜の形成およびろ過障壁機能において必須となるタンパク質である。Podocalyxin は、C 末端側の細胞質領域の PDZ (PSD-95 / Dlg / ZO-1) 結合モチーフ (アミノ酸配列 DTHL) で NHERF2 の PDZ ドメインに結合する。この結合を介して、Podocalyxin は、細胞質で NHERF2

および Ezrin を介して Actin 細胞骨格に繫留され、複合体を形成することが報告されている (Fig. 6)。この複合体は糸球体障害を誘起するピューロマイシンアミノヌクレオシドや膜表面の負電荷を中和する硫酸プロタミン処理、またはシアル酸分解酵素であるシアリダーゼの処理によって Podocalyxin の負電荷を形成するシアル酸を除去することで破壊され、ラットにおいて足突起の消失を引き起こすことが報告されている⁴⁾。

このように、糸球体足細胞のタンパク質ろ過障壁において、アピカル膜での Podocalyxin/NHERF2/Ezrin の複合体形成が重要な役割を担うと考えられており、足細胞でのタンパク質ろ過に必須となる Podocalyxin の局在制御における Ezrin の寄与が示唆されている。しかし、これまでに、動物個体を用いて、糸球体における Ezrin が果たす役割については研究がなされていなかった。そこで、本研究においては、*Vil2^{kd/kd}* マウスを用いて Podocalyxin の発現変化や足細胞の形態変化、尿中へのアルブミン漏出を解析することで、足細胞のタンパク質ろ過機能に対して Ezrin の与える影響について検討を行った。

【結果】

マウス糸球体における ERM タンパク質の発現分布

はじめに、野生型マウスの糸球体における ERM タンパク質の発現分布を、腎組織における免疫蛍光染色法を用いて解析した。その結果、Ezrin は足細胞に発現が認められた (Fig. 7)。Ezrin の糸球体におけるより詳細な局在を解析するため、内皮細胞のマーカーである CD34 との共染色を行ったところ、両者は異なる発現分布を示し、Ezrin は糸球体においては足細胞に局在していることが確認された (Fig. 8A)。一方、Radixin および Moesin は、足細胞における発現が認められず (Fig. 7)、Moesin は CD34 と部分的に共局在した (Fig. 8B)。この結果から、足細胞においては、ERM タンパク質の中でも Ezrin のみが発現していることが確認された。

Vil2^{kd/kd} マウスにおける糸球体の形態変化

Vil2^{kd/kd} マウスの糸球体において、形態異常が見られるかを確かめるため、野生型および *Vil2^{kd/kd}* マウスの腎組織の H.E.染色を行い、糸球体の組織学的解析を行った。その結果、*Vil2^{kd/kd}* マウスの糸球体に異常は見られなかった (Fig. 9A)。さらに詳細な糸球体構造の解析を行うため、電子顕微鏡による解析を行った。しかし、*Vil2^{kd/kd}* マウスの足細胞足突起に形態異常は認められなかった (Fig. 9B)。糸球体基底膜の単位長さ (μm) 当たりの足突起の数を比較しても、野生型および *Vil2^{kd/kd}* マウス間に有意な差は見られなかった (Fig. 9C)。

Vil2^{kd/kd} マウスにおける尿中アルブミン排泄

次に、*Vil2^{kd/kd}* マウスにおいて糸球体の機能を確認するために、野生型および *Vil2^{kd/kd}* マウスのスポット尿を採取し、SDS-PAGE および CBB 染色を用いて尿中へのアルブミン漏出を解析した。コントロールとして BSA を同時に泳動して比較したが、野生型だけでなく *Vil2^{kd/kd}* マウスでも、血清アルブミンの分子量約 60 kDa にバンドは見られなかった (Fig. 10)。この結果は、形態変化の解析において

Vil2^{kd/kd} マウスで異常が認められなかったことと対応する結果であった。

Vil2^{kd/kd} マウス糸球体における Ezrin 関連タンパク質の細胞内局在

足細胞において Ezrin との複合体形成が報告されている NHERF2 および Podocalyxin の共免疫染色を行った。その結果、野生型マウスでは、Ezrin は NHERF2 および Podocalyxin と共局在を示した (Fig. 11)。一方、Actin ミクロフィラメントと会合する Synaptopodin や、スリット膜近傍に存在する Podocin とは共局在しなかった (Fig. 11)。

Vil2^{kd/kd} マウスの足細胞では、Ezrin の発現はほとんど認められなかった (Fig. 12)。また、NHERF2 および Podocalyxin のアピカル膜における発現、Synaptopodin および Podocin の足突起における発現に変化は見られなかった (Fig. 12)。以上の結果から、Ezrin は NHERF2 および Podocalyxin の適切なアピカル膜の局在には関与していないことが確認された。また、Radixin および Moesin の局在には変化が見られず、Ezrin ノックダウンによる代償的な発現上昇もみられなかった (Fig. 13)。

Vil2^{kd/kd} マウス単離糸球体における Ezrin 関連タンパク質の発現

野生型および *Vil2^{kd/kd}* マウスの腎皮質から糸球体を単離し、Ezrin 関連タンパク質の発現量をウェスタンブロッティングにより評価した。野生型マウスから単離した糸球体では、ERM タンパク質のすべてが検出されたが、中でも Ezrin および Moesin が豊富に発現していた (Fig. 14A)。 *Vil2^{kd/kd}* マウスにおいては、免疫染色で観察された結果と同様に、Ezrin の発現はほとんど認められず、Radixin、Moesin の代償的な発現量の増加は認められなかった (Fig. 14A)。Ezrin と結合すると見られる Podocalyxin および Rho-GDI α の発現量は、野生型および *Vil2^{kd/kd}* マウスの間で変化はなかった (Fig. 14)。一方、NHERF2 の発現量については、野生型マウスと比較して有意な差はなかったが、 *Vil2^{kd/kd}* マウスにおいてわずかに減少する傾向が見られた (Fig. 14)。

以上のことから、*Vil2^{kd/kd}* マウスでは、糸球体の形態形成や、タンパク質ろ過機能に異常がないことが明らかとなった。また、Podocalyxin の足細胞におけるアピカル膜での発現や局在に影響を与えないことが確認された。このように、通常の状態では、Ezrin の発現抑制は、糸球体の形態形成や機能に影響しないことが明らかとなった。

Vil2^{kd/kd} マウスにおける糸球体障害時の感受性の変化

糸球体障害時における Ezrin の役割を解析した。ADR および LPS を野生型および *Vil2^{kd/kd}* マウスに投与し、糸球体障害時の足細胞の形態形成およびタンパク質ろ過機能の変化を比較した。野生型マウスでは、ADR 単回静脈内投与 7 日後において、電子顕微鏡解析によって ADR 未投与マウスと比較して足突起の減少が見られることを確認した。また、ADR 投与モデルでは、ADR 未投与時と比較して尿中アルブミン排泄量の増加も認められた (Fig. 15)。LPS 投与モデルにおいても、LPS 腹腔内投与後 24 時間で重度の足突起の減少が見られることを確認した。また、尿中へのアルブミン漏出が見られた (Fig. 16)。これまでに、マウスでは ADR 単回静脈内投与モデルでは、ADR 投与後 5 日目より過度のタンパク尿が出現することが報告されている^{33,34)}。また、LPS 腹腔内投与においては、投与後 24 時間後にはアルブミン尿が誘発されることが報告されており³⁴⁾、ADR、LPS 投与による適切な糸球体障害モデルが作製できたと考えられる。

一方で、*Vil2^{kd/kd}* マウスにおいては、ADR 投与群でも、足突起の減少や尿中アルブミン排泄量の増加が認められなかった (Fig. 15)。LPS 投与モデルでも、野生型マウスで見られた足突起の消失レベルが有意に抑制されていた。尿中アルブミン排泄量の増加は見られたが、野生型マウスと比較してその量は有意に低かった (Fig. 16)。以上のことから、*Vil2^{kd/kd}* マウスでは、糸球体障害における足突起の消失やタンパク質ろ過機能の損失レベルが低下するという表現型が認められた。

Vil2^{kd/kd} マウスの単離糸球体における Rho GTPase 活性の解析

足細胞の形態およびタンパク質過機能の維持において、細胞骨格の制御に関わる低分子量 GTPase の一種である Rho GTPase が重要であることが知られている。即ち、足細胞が形成する糸球体過障壁の維持には Actin 細胞骨格が作る構造が重要であり、Rho GTPase が分子スイッチとして働き、Actin 細胞骨格の動的变化を調節していると考えられている³⁵⁾。哺乳動物の Rho GTPase は RhoA、Rac1 および Cdc42 からなり、RhoA はストレスファイバー、Rac1 は葉状仮足 (lamellipodia)、Cdc42 は糸状仮足 (filopodia) の形成にそれぞれ重要であることが報告されている^{36,37)}。Ezrin は足細胞において、NHERF2 との結合を介して Podocalyxin と Actin 細胞骨格とをクロスリンクする働きだけでなく、Rho GTPase の調節因子として働くことが知られている²⁾。GST 融合タンパク質を用いたプルダウンアッセイによって、Ezrin の FERM ドメインが、Rho-GDI と直接的に結合することが明らかにされている^{6,38)}。その結果、Rho GTPase の Rho-GDI からの解離を促進することで、間接的に Rho を活性化する。我々は、野生型および *Vil2*^{kd/kd} マウスから単離した糸球体における Rho GTPase 活性を測定した。その結果、*Vil2*^{kd/kd} マウス糸球体において、RhoA の活性が、野生型マウス糸球体と比較して有意に高いことが明らかとなった。一方、Rac1 活性については有意に低く、Cdc42 活性について有意な差は認められなかった (Fig. 17A)。

さらに、ADR および LPS 投与による糸球体障害モデルにおける Rho GTPase 活性についても解析した。その結果、ADR 投与モデルでは、RhoA 活性が *Vil2*^{kd/kd} マウスで野生型マウスより有意に高かった (Fig. 17A)。一方、Rac1 活性については、*Vil2*^{kd/kd} マウスで有意に低く (Fig. 17A)、Cdc42 活性は、両遺伝子型ともに ADR 投与によって活性変化は認められなかった (Fig. 17A)。

LPS 投与モデルでは、RhoA 活性は ADR 投与時と同様に、*Vil2*^{kd/kd} マウスで野生型マウスより有意に高かった (Fig. 17B)。また、Rac1 活性についても、*Vil2*^{kd/kd} マウスで有意に RhoA 活性が低かった (Fig. 17B)。これらの結果から、*Vil2*^{kd/kd} マウス糸球体において、RhoA 活性の上昇および Rac1 活性の低下が、糸球体足細胞の障害時の足突起の減少に対する抵抗性につながる可能性が示唆された。ま

た、足細胞障害時には、Cdc42 活性は変化しないことが確認された。

【考察】

Ezrin は足細胞のアピカル膜に発現する

単離した糸球体のウェスタンブロッティングおよび免疫組織染色の結果、糸球体では主に Ezrin、Moesin の発現が見られた。Ezrin は糸球体の足細胞に発現しており、その中でもアピカル膜領域において Podocalyxin と局在し、足突起に局在する Synaptopodin や Podocin とは共局在しないことが明らかとなった。Table 3 に糸球体における ERM タンパク質の局在を示す。Moesin および Radixin は Podocalyxin とは共局在を示さず内皮細胞に局在しており、*Vil2^{kd/kd}* マウスの糸球体足細胞において Ezrin の機能を代償するような発現変化は認められなかった。このことから、足細胞では ERM タンパク質のうち Ezrin のみが発現し、糸球体機能に関与していることが考えられた。

Ezrin は足細胞の形態形成および Podocalyxin の適切な局在に影響を及ぼさない

Ezrin は、足場タンパク質である NHERF2 を介して足細胞の形態維持に関わるタンパク質である Podocalyxin の C 末端側の細胞内領域において相互作用するため、糸球体の機能において重要な役割を果たすことが想定された⁴⁾。しかしながら、本研究の結果から、*Vil2^{kd/kd}* マウスにおいて、Podocalyxin のアピカル膜での発現や局在は障害されておらず、足細胞での足突起の形成異常も認められなかった。Podocalyxin のノックアウトマウスでは、足細胞において足突起およびその足突起間に形成されるスリット膜に異常が見られ、周産期の致死を引き起こすことが報告されている³²⁾。一方、NHERF2 のノックアウトマウスでは、明らかな腎臓における表現型は確認されず、Podocalyxin/NHERF2/Ezrin 複合体が形成されなくても Podocalyxin は足細胞のアピカル膜に局在することが示された³⁹⁾。今回、*Vil2^{kd/kd}* マウスの糸球体では、NHERF2 の発現量が低下する傾向が見られた。このことから、Ezrin が足細胞での NHERF2 のアピカル膜での発現を促進する可能性が示唆されるが、NHERF2 のノックアウトマウスと同様に Podocalyxin のアピカル膜における発現に影響しないことが明らかとなった。しかし、本結果

は Ezrin の発現を完全に欠損した条件ではなく、わずかに存在する Ezrin が十分な機能を果たしている可能性も考えられる。そのため、Ezrin の Podocalyxin の発現制御における役割については、足細胞特異的な Ezrin のノックアウトマウスによる解析を行うなど、さらなる検討が必要である。

***Vil2^{kd/kd}* マウスは正常な足突起を形成し、尿中へのタンパク質漏出を引き起こさない**

野生型および *Vil2^{kd/kd}* マウスのスポット尿からは、アルブミンは確認されなかった。Podocalyxin のノックアウトマウスでは周産期より腎不全を呈し³²⁾、ヒトにおいても機能喪失型変異によって先天性ネフローゼ症候群を呈することが報告されている⁴⁰⁾。Podocalyxin は、足細胞のアピカル膜においてシアル化を受けることで負に帯電し、電気的な反発により足突起の融合を防ぎ、足細胞におけるタンパク質ろ過障壁としての機能の維持に重要であると考えられている^{31,32)}。

Ezrin は足細胞において Podocalyxin と複合体形成することから、明らかな足突起の形態異常や Podocalyxin の発現変化がなくとも、Ezrin の発現低下がタンパク質ろ過機構に異常をきたす可能性が考えられた。しかし、本研究では *Vil2^{kd/kd}* マウスでは正常な足突起が形成され、尿中へのタンパク質漏出を引き起こさないことが明らかとなった。

足細胞の細胞膜のタンパク質ろ過機構を支えるタンパク質を欠損させたマウスでは、それぞれ尿中へのタンパク質漏出に関わる異常が見られている。スリット膜を構成する Podocin、CD2AP および Neph1 のノックアウトマウスではそれぞれ致死的なタンパク尿が見られ^{26,41,42)}、基底膜に発現する $\alpha3$ や $\beta1$ Integrin および CD151 についても、それぞれのノックアウトマウスがタンパク尿を呈することが報告されている^{28,29,43)}。これに対して *Vil2^{kd/kd}* マウスでは、このような表現型が認められず、Ezrin の発現抑制が、足細胞において膜タンパク質によるタンパク質ろ過機能に影響しないことが明らかとなった。

***Vil2^{kd/kd}* マウスの糸球体障害モデルでは足細胞の形態や機能の異常に抵抗性が見**

られる

糸球体障害モデルの作製に汎用される ADR および LPS を野生型マウスに投与したところ、どちらの糸球体障害モデルでも足突起の減少とそれに伴うタンパク尿の出現が認められた。これに対して *Vil2^{kd/kd}* マウスでは、ADR を投与しても足突起の消失およびタンパク尿の出現は認められなかった。また、*Vil2^{kd/kd}* マウスに LPS を投与しても軽度の足突起の減少およびタンパク尿が見られたが、どちらの表現型も野生型マウスと比較して有意に低い障害であった。これまで、Podocalyxin/NHERF2/Ezrin 複合体の破壊が、Podocalyxin の Actin 細胞骨格との解離を引き起こし、糸球体障害モデルラットにおけるタンパク尿に関与することが示唆されてきたことから^{4,44)}、Ezrin 欠損に伴って糸球体の機能障害が起こることを想定してきた。しかしながら、*Vil2^{kd/kd}* マウスでは、逆に、ADR、LPS 投与モデルにおいて糸球体障害への抵抗性を示したことから、Ezrin が足細胞において、Podocalyxin/NHERF2/Ezrin 複合体形成とは異なる生理機能をもつことが示唆された。

Vil2^{kd/kd} マウスの糸球体では Rho GTPase 活性の異常が引き起こされている

Ezrin は膜タンパク質と Actin 細胞骨格とをクロスリンクする機能とは別に、Rho GTPase の活性を制御することで、Actin 細胞骨格の調節因子として重要な機能をもつことが知られている³⁾。Rho GTPase である RhoA、Rac1 および Cdc42 のそれぞれの活性のバランスが、糸球体足細胞における Actin 組織化を制御し、足突起の形成および消失に関与する^{35,38)}。Rho GTPase は、GDP 結合型である不活性型から GTP 結合型である活性型になることで下流のシグナル分子に情報を伝達し、細胞骨格系の変化を引き起こす。足細胞では、Cdc42 は足細胞の発達に必須であるが、Rac1 および RhoA は足細胞の維持においてより重要であることが知られている⁴⁵⁾。足細胞特異的な Rac1 欠損マウスでは、糸球体の機能障害は見られず、足細胞は正常な足突起を形成していることが確認されている。硫酸プロタミン投与による急性足細胞障害モデルでは、足細胞特異的 Rac1 欠損が足突起の消失に対して保護的に働いていることも明らかにされている⁴⁶⁾。Rac1 の活

性化阻害剤 EHT1846 および Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤 SAR407899 が慢性腎疾患における足細胞障害に保護的に働くことなども示されており⁴⁷⁾、Rho GTPase の足細胞の機能調節において重要な役割を果たし、特に過剰な Rac1 の活性化は足細胞の障害を引き起こすと考えられる。本研究において、*Vil2^{kd/kd}* マウスでは、野生型マウスと比較して糸球体障害時に Rac1 活性の低下が認められており、Ezrin の発現抑制が足突起の減少に対して保護的に働いたことが推察される。また、RhoA の活性化は、足細胞の足突起を安定化させ、障害時の足細胞の消失を防ぐ働きをすることが報告されている³⁷⁾。*Vil2^{kd/kd}* マウスでは、糸球体障害時に RhoA 活性の上昇も見られており、足突起の減少に対して抵抗性を示したことが考えられる。一方で、足細胞特異的な Cdc42 欠損マウスでは、足細胞における足突起の消失、重度のタンパク尿、糸球体硬化症などの表現型が確認されているが⁴⁵⁾、*Vil2^{kd/kd}* マウスでは、Cdc42 活性は変化しなかった。以上のことから、*Vil2^{kd/kd}* マウスで見られた糸球体障害時の足突起の減少やタンパク尿に対する抵抗性は、Rac1 および RhoA 活性に関連している可能性が考えられる。

Ezrin は、Rho GTPase の活性化を阻害する Rho GDI と FERM ドメインで結合することで Rho GDI による阻害作用を抑制し、Rho GTPase を活性化する役割をもつことが知られている⁶⁾。そのため、*Vil2^{kd/kd}* マウスにおいて Rac1 活性が低下した現象は、Ezrin の発現が抑制されることで、Rho GDI が活性化し、間接的に Rac1 の活性化が抑制されたという機序が考えられる。実際に、Rho GDI α のノックアウトマウスでは、Rac1 の異常な活性化から足突起の消失が誘導されることが報告されており⁴⁸⁾、Rho GDI を介した Rac1 活性は足突起の形成において非常に重要な役割を果たすことが示唆される (Table 4)。

一方で、*Vil2^{kd/kd}* マウスでは、野生型マウスと比較して、ADR および LPS 投与時の RhoA 活性が有意に高かった (Table 4)。RhoA と Rac1 は互いに拮抗的に働くことが知られており、Rac1 の活性低下が RhoA の活性化を誘導することが報告されている^{37,49)}。そのため、*Vil2^{kd/kd}* マウスにおける Rac1 の活性化の抑制が、RhoA の二次的な活性化に繋がった可能性が考えられる。

以上、*Vil2*^{kd/kd} マウスの糸球体足細胞において、Podocalyxin の適切なアピカル膜への局在は障害されず、糸球体の形態異常やタンパク質ろ過障壁の障害は見られなかった。しかしながら、ADR や LPS 処置による糸球体障害時では、足細胞の足突起消失やアルブミン尿などの病態に抵抗性を示すことが明らかとなった。さらに、*Vil2*^{kd/kd} マウスでは、足突起の減少を引き起こす Rho GTPase である Rac1 活性の低下および RhoA 活性の上昇が引き起こされており、糸球体障害時の足細胞における形態およびタンパクろ過機能異常を軽減することが考えられた。

第二部

尿細管における ERM タンパク質の役割

【背景】

尿細管では、アピカル膜に発現する様々な膜輸送タンパク質によって原尿から電解質や水分を再吸収している。糸球体ろ過を受けて生成した原尿は、近位尿細管、ヘンレループの下行脚、上行脚、遠位尿細管の順に通過した後、集合管に流入し、それぞれのセグメントで異なった再吸収や分泌を受けることで体内における様々な恒常性を調節している。近位尿細管には特に多くの種類のトランスポーターが発現しており、生体に必須となる栄養素の大部分が再吸収される。ERM タンパク質のうち Ezrin は、近位尿細管上皮細胞のアピカル膜側に発現している。Ezrin は、FERM ドメインを介して足場タンパク質である NHERF1 と結合する⁵⁰⁾。ブタの腎尿細管由来の LLC-PK1 細胞を用いた解析では、NHERF1 が近位尿細管のアピカル膜や破骨細胞の基底膜に発現するリン酸輸送体である Npt2a の C 末端の PDZ 結合モチーフで結合すること、Ezrin/NHERF1/Npt2a の複合体形成が Npt2a によるリン酸輸送に重要となることが報告されている⁵⁰⁻⁵²⁾。その後、*Vil2^{kd/kd}* マウスの近位尿細管では Npt2a および NHERF1 の刷子縁膜における発現減少と、サブアピカル領域およびゴルジ体への蓄積が生じていることが明らかとなった¹¹⁾。また、*Vil2^{kd/kd}* マウスは Npt2a を介した尿中へのリン酸排泄の増加および血中リン酸濃度の低下が確認され、骨形成において重要なリン酸や Ca^{2+} のバランス異常による成長遅延をきたすことが報告されている¹¹⁾。

一方、Ezrin と同じ ERM タンパク質の 1 つである Moesin は、尿細管に発現する Na^+ , K^+ , 2Cl^- 共輸送体 2 (NKCC2) と複合体形成することが報告されている¹³⁾。Moesin は FERM ドメインにおいて、NKCC2 の C 末端領域と結合する。LLC-PK1 細胞で、Moesin をノックダウンすると、cNKCC2 (NKCC1/NKCC2 のキメラ体) のエンドサイトーシスには影響することなく、エキソサイトーシスを抑制して、

細胞膜表面での発現が低下することが報告されている¹³⁾。一方、血球系や培養細胞を用いた腎臓以外の研究では、*Msn*^{-/-}マウスを用いた実験において、Moesinが膜タンパク質や PI(4,5)P₂ との結合を介してスフィンゴシン 1 リン酸受容体 1 (S1PR1) やトランスフェリン受容体などの膜タンパク質のエンドサイトーシスを制御することが報告されている。T 細胞では、Moesin が S1PR1 の正常なクラスリン依存的なエンドサイトーシスにおいて必要であることや⁵³⁾、*in vitro* の系において Moesin が F-actin や脂質ラフトに豊富に存在する PI(4,5)P₂ との結合を介してクラスリン被覆小胞の細胞内輸送制御に関わることが示唆されている⁵⁴⁾。

NKCC2 (SLC12A1) はカチオン共役 Cl⁻輸送体である SLC (Solute carrier) 12 ファミリーに属する膜輸送タンパク質である。ヒトの NKCC2 は 1,099 アミノ酸 (マウスおよびラットでは 1,095 アミノ酸) からなる分子量約 120 kDa のタンパク質で、12 回膜貫通型の膜内在性タンパク質として N 末端および C 末端の両方を細胞質側に出した形で発現する⁵⁵⁾。NKCC2 は、尿細管ヘンレールの太い上行脚 (Thick ascending limb: TAL) や遠位尿細管のマクラデンサ細胞のアピカル膜に特異的に発現する膜輸送タンパク質で、Na⁺、K⁺、Cl⁻を 1:1:2 の割合で細胞内へと輸送し、原尿中の電解質再吸収を介した体液バランスや糸球体濾過量 (GFR) の調節において重要な役割を担っている。ヘンレールは、下行脚から上行脚にかけてループ構造をとっており、下行脚では電解質の透過性が低く、かつ水の透過性を高くすることで原尿の濃縮を行っている。これに続く TAL では、濃縮された原尿から、アピカル膜に局在する NKCC2 によって、効率的に電解質の再吸収が行なわれている。TAL での NKCC2 による電解質再吸収は、糸球体ろ過を受けた原尿の 25-30%におよび、体液中の電解質バランスを維持する上で必要不可欠なものである。NKCC2 によって吸収された Na⁺、Cl⁻はそれぞれ基底膜に発現する Na⁺,K⁺-ATPase、クロライドチャンネル ClC-Kb によって細胞外へ輸送され、K⁺はアピカル膜に発現するカリウムチャンネルである ROMK によって管腔へ輸送、リサイクルされる (Fig. 18)。NKCC2 の遺伝欠損型の変異は重度の電解質喪失に特徴付けられるヒトの I 型 Bartter 症候群を引き起こす⁵⁶⁾。NKCC2 のノックアウトマウスにおいても、Bartter 症候群と同様に電解質や体液喪失を引

き起こすことが報告されている⁵⁷⁾。一方、NKCC2による過剰な再吸収が高血圧症の原因となる可能性も指摘されている。特に black people は、脱水に対する耐性を高めるため、NKCC2の過剰な活性化によるNa⁺および水の再吸収が亢進しており、食塩感受性高血圧のリスクの増大を示す可能性が示唆されている^{58,59)}。また、NKCC2は現在臨床上で汎用されているフロセミドなどのループ利尿薬の標的輸送体であり、その生理的意義が大きい。そのため、NKCC2のアピカル膜での発現制御機構を解明することは非常に重要であると考えられる。

NKCC2のアピカル膜での発現は、エキソサイトーシスによるアピカル膜表面での発現とエンドサイトーシスによる膜表面から細胞内への回収のバランスにより調節されている。脱水時など、NKCC2によるNaCl再吸収が必要となる場合には、バソプレシン、副甲状腺ホルモン(PTH)、グルカゴンなどのホルモン応答によって、cAMP/PKA経路を介して即時的にNKCC2の細胞膜への発現誘導が促進される^{60,61)}。逆に、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、エンドセリンおよび一酸化窒素(NO)などはグアニル酸シクラーゼを活性化することでcGMPの産生を促進し^{62,63)}、ホスホジエステラーゼ2(PDE2)を活性化する。その結果として、cAMPを減少させ、NKCC2のアピカル膜へのエキソサイトーシスを低下させることが知られている⁶⁴⁾(Fig. 19A)。cAMP/PKA経路の活性化は、NKCC2のN末端側の細胞内領域に存在するSer¹²⁶およびC末端側の細胞内領域に存在するSer⁸⁷⁴のリン酸化を亢進することで、NKCC2のエキソサイトーシスによる細胞膜表面での発現を誘導することが知られている⁶⁵⁾。このcAMP/PKA経路の活性化は、NKCC2と小胞膜融合タンパク質であるVAMP2との結合を促進し、エキソサイトーシスを亢進させることが明らかとなっている⁶⁶⁾。

一方、NKCC2のエンドサイトーシスにはクラスリン依存적および非依存적経路の両方の過程が関与していると考えられている⁶⁷⁾。Methyl-β-cyclodextrinにより脂質ラフト構造を破壊するとNKCC2のエンドサイトーシスが完全に阻害されることが報告されているが⁶⁸⁾、NKCC2の細胞膜上からのエンドサイトーシスにおける制御機構については十分に解明されていない(Fig. 19B)。

そこで、本研究においては、MoesinとNKCC2の複合体形成における生理的

な意義を解明するため、*Msn*^{-/-}マウスの尿細管での電解質再吸収に関わるフェノタイプおよびNKCC2のエンドサイトーシスへの影響を解析することで、NKCC2を介した電解質再吸収における *Moesin* の役割を検討した。

【結果】

マウス尿細管における Moesin の発現分布

はじめに、野生型マウスにおける尿細管での Moesin の発現を、腎組織における免疫蛍光染色を用いて解析した。Moesin は腎臓の、主に内皮細胞および尿細管上皮細胞に発現が見られた (Fig. 20)。中でも尿細管上皮では、Moesin は近位尿細管のアピカル膜に発現する低分子量タンパク質のエンドサイトーシス受容体である Megalin や、TAL において特異的に発現・分泌される Tamm Horsfall protein (THP) と共局在することが確認された。一方、集合管のアピカル膜に発現する Aquaporin 2 (AQP2) とは共局在しないことが明らかとなった。また、 $Msn^{-/-}$ マウスでは、これらの組織における Moesin の発現が欠損していることが確認された (Fig. 20)。

$Msn^{-/-}$ マウスにおける腎臓の形態変化

$Msn^{-/-}$ マウスにおいて、これまでの報告では、腎臓における表現型に注目した研究はなされていない¹⁴⁾。我々は、野生型および $Msn^{-/-}$ マウスの腎臓を用いて H.E.染色を行い、Moesin 欠損時の腎臓の組織学的解析を行った。その結果、 $Msn^{-/-}$ マウスの糸球体や尿細管の形態には異常は見られなかった (Fig. 21)。

$Msn^{-/-}$ マウスにおける腎機能解析

次に、Moesin の欠損における腎機能への影響を解析するために、野生型および $Msn^{-/-}$ マウスについて代謝ケージを用いて飲水量、尿量を記録し、尿中および血漿中の電解質・クレアチニン濃度を測定した。 $Msn^{-/-}$ マウスでは、血漿 Cl^{-} 濃度の有意な上昇が認められた (Table 5)。また、尿中への Na^{+} および Cl^{-} の総排泄量 (ENa および ECl) が低下する傾向にあった。一方で、野生型マウスと比較して血漿クレアチニン濃度に変化はなかった (Table 5)。

尿量については、野生型および $Msn^{-/-}$ マウスの間で有意な差は見られなかったが、 $Msn^{-/-}$ マウスにおいて糸球体ろ過量 (GFR) の有意な低下が認められた。

GFR に反比例した値をとる Na^+ 、 Cl^- の分画排泄率 (FENa、FECl) については有意な上昇を示した。 $Msn^{-/-}$ マウスでは血漿 Cl^- 濃度の上昇が見られたことから、血液ガス分析による血中の重炭酸イオン濃度および pH の測定を行ったが、野生型および $Msn^{-/-}$ マウスの間で有意な差は見られなかった (Table 5)。このことから、 $Msn^{-/-}$ マウスに起きている血漿 Cl^- 濃度の上昇は代謝性アシドーシスに起因するものではないことが示唆された。

$Msn^{-/-}$ マウスの TAL 細胞膜上における NKCC2 の発現量の変化

Moesin の発現する TAL における電解質再吸収に関わるタンパク質の発現および局在の変化を解析するために、野生型および $Msn^{-/-}$ マウスの腎髄質におけるウェスタンブロッティング、免疫蛍光染色を行った。ウェスタンブロッティングでは、TAL において発現する THP の発現量について、野生型および $Msn^{-/-}$ マウス間で有意な差は認められず、各サンプル間での TAL の含量に差異は見られなかった。TAL での電解質再吸収に関わる NKCC2 および ROMK の発現量、また集合管に発現する AQP2 の発現量についても野生型および $Msn^{-/-}$ マウス間で有意な差は見られなかった (Fig. 22A)。また、免疫蛍光染色においても、野生型および $Msn^{-/-}$ マウスともに TAL においてアピカル膜に NKCC2 および ROMK が局在しており、その局在に変化は見られなかった (Fig. 22B, C)。

より詳細に NKCC2 の細胞膜上での発現量を検討するため、Ares らの方法⁶⁸⁾を参考に、マウスの腎髄質組織を切り出してコラゲナーゼ処理し、TAL を含む尿細管細胞懸濁液を調製した。その後、野生型および $Msn^{-/-}$ マウスの TAL 細胞膜上のタンパク質を膜不透過性のビオチン化試薬である Sulfo NHS-SS-biotin を用いて標識し、アビジン-ビオチンの相互作用を利用してプルダウンし、NKCC2 抗体でウェスタンブロットすることで細胞膜上での NKCC2 の発現量を定量的に解析した。その結果、野生型と $Msn^{-/-}$ マウスでは、組織での NKCC2 および THP の発現量総量に差異は見られなかったが、一方で、細胞膜上での NKCC2 の発現レベルは $Msn^{-/-}$ マウスで有意に増加していることが明らかとなった (Fig. 23)。

Msn^{-/-} マウスにおける NKCC2 の内部移行の変化

Msn^{-/-} マウスにおいて、TAL を含む尿細管細胞懸濁液を用いて、Moesin 欠損による NKCC2 の内部移行への影響を解析した。尿細管細胞懸濁液をビオチン化標識後に、37°C で 30 および 60 分間 NKCC2 の内部移行を引き起こさせ、その後細胞膜上に残留したタンパク質のビオチン標識を細胞膜不透過性の還元剤である Sodium 2-mercaptoethane sulfonate (MESNa) を用いて切断した。内部移行した NKCC2 のみをアビジンでプルダウンし、定量的に解析した。野生型マウスにおいて、4°C では 30 および 60 分間後に NKCC2 の内部移行は見られなかったが、37°C の条件では、時間依存的に NKCC2 の内部移行が観察された (Fig. 24)。この内部移行は野生型および *Msn*^{-/-} マウスの両方ともに見られたが、*Msn*^{-/-} マウスでは野生型マウスと比較して、細胞膜上での発現量に対する NKCC2 の内部移行量が有意に低下していることが明らかとなった (Fig. 24)。

Msn^{-/-} マウスにおける NKCC2 のエンドサイトーシスの変化

次に、Koulen らの方法⁶⁹⁾を参考に、野生型および *Msn*^{-/-} マウスの腎髄質の postnuclear fraction を Optiprep による密度勾配遠心法によって分画し、それぞれの NKCC2 の膜分布の違いを解析した。膜画分のマーカーとして Rab5 (初期エンドソーム) および Rab11 (リサイクリングエンドソーム) を用いた。その結果、野生型マウスにおいて、NKCC2 は Rab11 陽性のリサイクリングエンドソーム画分に発現が見られ、Rab5 陽性の初期エンドソーム画分には検出されなかった (Fig. 25A)。また、Moesin の 30-40% は Rab5 陽性の初期エンドソームの画分に発現が見られた (Fig. 25A, C)。しかし、*Msn*^{-/-} マウスでは、リサイクリングエンドソーム画分のほか、Rab5 陽性の初期エンドソームの画分にも NKCC2 の発現が見られた (Fig. 25B, C)。

Msn^{-/-} マウスにおける NKCC2 の脂質ラフトでの局在の変化

次に、エンドサイトーシスにおいて重要なマイクロドメインである脂質ラフト

での NKCC2 の局在を解析した。野生型および *Msn*^{-/-} マウスの腎髄質より調製した粗膜画分を、Optiprep を用いた密度勾配遠心法分離し、脂質ラフトを分画した。その結果、野生型マウスでは、Flotillin-2 陽性の脂質ラフト画分のみ NKCC2 が局在した (Fig. 26A)。しかし、*Msn*^{-/-} マウスでは、脂質ラフト外にも NKCC2 の発現が見られ、*Msn*^{-/-} マウスにおいて NKCC2 の脂質ラフトへの局在が障害されていることが示唆された (Fig. 26B)。

Msn^{-/-} マウスにおける NKCC2 の輸送活性

さらに、Moesin 欠損による NKCC2 の細胞膜上での貯留が、NKCC2 の輸送活性に及ぼす影響を評価した。野生型および *Msn*^{-/-} マウスの TAL を含む尿細管細胞懸濁液に対して、K⁺ のアナログである TI⁺ の蛍光インジケータ色素 (FluxOR) を取り込ませて、NKCC2 による TI⁺ の取り込み活性を定量的に比較した。まず、野生型マウスの尿細管懸濁液において、時間依存的および TI⁺ の濃度依存的な取り込みが見られることを確認した (Fig. 27A, B)。NKCC2 の阻害剤であるフロセミド (100 μM) 処理条件では、およそ 75% の取り込みが阻害された。*Msn*^{-/-} マウスでは、野生型マウスに比べて、NKCC2 によると見られるフロセミド感受性の TI⁺ 輸送活性の上昇が観察された (Fig. 27C, D)。

水負荷時の *Msn*^{-/-} マウスにおける NKCC2 の発現変化

バソプレシン分泌を抑制し、NKCC2 のエキソサイトーシスを抑制することで、エンドサイトーシスによる NKCC2 の発現変化を評価するために、野生型および *Msn*^{-/-} マウスにおいて 3% スクロース水溶液を飲水させた水負荷モデルによる細胞膜上での NKCC2 の発現量の比較を行った。その結果、慢性的な水負荷の条件下において、細胞膜上の NKCC2 の発現量について、野生型マウスでは有意に低下していたが、*Msn*^{-/-} マウスでは、コントロールの野生型マウスレベルの発現が見られた。一方で、腎髄質全体における NKCC2 の発現量は、野生型および *Msn*^{-/-} マウス共に、コントロールと水負荷時に変化は見られなかった (Fig. 28)。

Msn^{-/-}マウスの腎皮質における COX-2 の発現変化

代謝ケージを用いた解析から、*Msn*^{-/-}マウスにおいて GFR が低下していることが明らかとなった (Table 5)。TAL から遠位側に続く部分で糸球体に入ったりする細動脈に接触する構造をとり、尿細管での尿流量や電解質濃度を感知して GFR を調節する尿細管-糸球体フィードバック (TGF) とよばれる機構が存在する。TGF においては、尿細管の細動脈と接触する遠位尿細管に存在するマクラデンサ細胞が、アピカル膜に発現する NKCC2 が原尿からの再吸収を介して、到達する NaCl 量を検知する。マクラデンサ細胞では、NaCl の再吸収に応じて Cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現量を変化させ、Prostaglandin E₂ (PGE₂) の産生を調節することで、輸入細動脈平滑筋の弛緩または収縮によって GFR を制御する^{70,71)}。そのため、野生型マウスの腎組織における免疫蛍光染色により、TAL から遠位部に向かって続くマクラデンサ細胞での Moesin の発現を調べた。その結果、マクラデンサ細胞において Moesin がアピカル膜で NKCC2 と共発現していることが明らかとなった (Fig. 29A)。

次に、TGF において重要な働きを担う腎皮質での COX-2 について、real-time PCR 法およびウェスタンブロッディングを用いて mRNA、タンパク質それぞれの発現レベルを解析した。その結果、*Msn*^{-/-}マウスでは、野生型マウスと比較して、COX-2 の mRNA、タンパク質ともに発現レベルが抑制されていることが明らかとなった (Fig. 29B-D)。また、PGE₂ についても EIA 法を用いて測定したところ、野生型マウスと比べて *Msn*^{-/-}マウスでは産生量が低下していることが確認された (Fig. 30)。

【考察】

マウス尿細管における Moesin の発現分布と、Moesin 欠損時の発現タンパク質や形態への影響

本研究の結果から、野生型マウスの腎髄質において、Moesin は主に TAL に発現し、集合管に発現しないことが確認された。また、*Msn*^{-/-} マウスでは、腎臓の糸球体や尿細管において形態異常は観察されず、免疫蛍光染色の結果では、TAL のアピカル膜に発現する NKCC2 や ROMK の局在の変化などは認められなかった。

Msn^{-/-} マウスでは、TAL における NKCC2 の細胞膜上での発現上昇に伴う表現型が認められた

本研究では、Moesin が TAL において NKCC2 と結合することに着目し、*Msn*^{-/-} マウスにおいて尿細管での電解質再吸収に関わる表現系の解析を行った。その結果として、*Msn*^{-/-} マウスでは尿中への 24 時間の Na⁺ および Cl⁻ 排泄量の減少が見られた。また、*Msn*^{-/-} マウスは、軽度の高 Cl⁻ 血症を呈することが明らかとなった。

さらに、マウス腎髄質より調製した TAL を含む尿細管懸濁液における解析により、*Msn*^{-/-} マウスでは野生型マウスと比較して細胞膜上での NKCC2 の発現が上昇していることが明らかとなった。同様に調製した懸濁液では、*Msn*^{-/-} マウスにおいて K⁺ アナログである TI⁺ の輸送活性の上昇が認められた。これらのことから、Moesin の欠損により、NKCC2 の細胞膜上での過剰な発現を引き起こし、尿中からの電解質再吸収が亢進している可能性が示唆された。

Msn^{-/-} マウスでは、TAL における NKCC2 のエンドサイトーシス異常が引き起こされている

Msn^{-/-} マウスでは、野生型マウスと比較して NKCC2 の細胞膜上での発現量が上昇していることが明らかとなった。また、NKCC2 の内部移行解析において、

Msn^{-/-} マウスでは 37°Cでのエンドサイトーシスによる NKCC2 の内部移行が障害されていることが明らかとなった。密度勾配遠心法を用いた NKCC2 の膜分布解析の結果から、野生型マウスにおいて NKCC2 の大部分は Rab11 陽性のリサイクリングエンドソームに局在していた。一方で、*Msn*^{-/-} マウスでは、野生型では見られない Rab5 陽性の初期エンドソームへの蓄積が見られた。

NKCC2 のアピカル膜での発現レベルは、エンドサイトーシスとエキソサイトーシスのバランスによって調節されている。特に、エンドサイトーシスについては、クラスリン依存性経路とクラスリン非依存性経路の両方が関わっており、初期エンドソームから大部分はリサイクリング経路へと移行すると考えられているが、その分子機序については未だ不明な点が多い。これまでに、T 細胞では、S1PR1 のクラスリン依存的なエンドサイトーシスにおいて、Moesin を欠損させるとクラスリン被覆小胞の形成に異常をきたすことで、S1PR1 の内部移行が障害されることが報告されている⁵³⁾。本研究では、Moesin 欠損により S1PR1 と同様に NKCC2 の内部移行に障害が確認された。しかし、S1PR1 の細胞内小胞における分布に関しては、野生型では初期エンドソームに観察されるが、*Msn*^{-/-} マウスではむしろ初期エンドソームへの分布が減少していることが報告されている。

一方、トランスフェリン受容体のエンドサイトーシスにおいて、HeLa 細胞を用いた *in vitro* の実験系では、Moesin が脂質ラフトに豊富に存在する PI(4,5)P₂ や F-actin との結合を介して、受容体を含むクラスリン被覆小胞の細胞内輸送制御に関わることが報告されている⁵⁴⁾。この報告では、Moesin の発現抑制が、クラスリン被覆小胞の初期エンドソームへの蓄積を引き起こすことを明らかにしており、本研究における *Msn*^{-/-} マウスでの NKCC2 の細胞内小胞分布と同様の結果を示している。

このように、Moesin は FERM ドメインでの膜タンパク質および PI(4,5)P₂ との結合、C 末端側での Actin との結合を介してエンドサイトーシスにおける小胞輸送の運動性を調節において重要な働きを担う可能性が示唆された。

Msn^{-/-} マウスでは、NKCC2 の脂質ラフトへの移行における障害が引き起こされ

ている

Msn^{-/-}マウスにおいて、野生型マウスと比較して NKCC2 の脂質ラフトへの局在が障害されていることが明らかとなった。これまでに、NKCC2 のアピカル膜における局在について、ラット腎髄質や TAL 細胞において、NKCC2 が脂質ラフトに集積していることが報告されている^{72,73})。また、Ortiz らは、NKCC2 のエンドサイトーシスが Methyl- β -cyclodextrin による脂質ラフト構造の破壊により完全に阻害されることを報告しており、正常な脂質ラフトへの局在が、適切な NKCC2 のエンドサイトーシスにおいて重要であることが示唆されている⁶⁸)。Moesin は、脂質ラフトに豊富に存在する PI(4,5)P₂ と結合することから^{2,3})、Moesin は、PI(4,5)P₂ との結合を介して NKCC2 を脂質ラフトに誘導する際に重要な役割を果たすことで、前述した小胞輸送の運動性の調節とは異なるエンドサイトーシス制御において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

***Msn*^{-/-} マウスでは、水負荷によるバソプレシン抑制時にも NKCC2 の細胞膜発現が上昇している**

NKCC2 のエキソサイトーシスによるアピカル膜への発現誘導は、主にバソプレシンによって調節されている。バソプレシンは側底膜に発現する V2 受容体に作用すると cAMP/PKA 経路の活性化を引き起こし、NKCC2 の N 末端側の細胞内領域に存在する Ser¹²⁶ および C 末端側の細胞内領域に存在する Ser⁸⁷⁴ のリン酸化を亢進することで、NKCC2 のエキソサイトーシスを誘導する⁶¹)。水負荷時にはバソプレシンの分泌が抑制され、エキソサイトーシスによる NKCC2 の細胞膜への発現誘導が抑制されると考えられているが、本条件下においても、*Msn*^{-/-} マウスでは、野生型マウスと比較して NKCC2 の細胞膜上での発現レベルが依然として上昇したままであった。このことから、Moesin は主に、エキソサイトーシスではなく、エンドサイトーシスによる NKCC2 のアピカル膜での発現制御に関与していることが示唆された。一方で、Carmosino らは、LLC-PK1 細胞における Moesin の発現抑制が、cNKCC2 のエンドサイトーシスには影響することなく、エキソサイトーシスを抑制して細胞膜上での発現が低下することを報告してい

る¹³⁾。cNKCC2は、NKCC1のN末端にHA-tagを付加し、C末端側の細胞内領域の一部であるapical sorting informationを担うと考えられる領域(930-1,079)をNKCC2に置換したNKCC1/NKCC2のキメラ体である。また、Carmosinoらの実験では、腎尿細管由来ではあるが、内在的にNKCC2を発現しないLLC-PK1細胞を用いた系にcNKCC2を強制発現させて解析を行っているため、TAL細胞でのNKCC2本来の細胞内小胞輸送を反映しているかどうかには疑問が残る。本研究では、マウス腎臓TAL細胞を用いて、内在的に発現するNKCC2のエンドサイトーシスに対するMoesin欠損の影響を解析したことから、生体内でのNKCC2の小胞輸送におけるMoesinが担う役割について、より決定的な証拠が得られたと考えられる。しかしながら、本研究においても、エキソサイトーシスを完全に阻害した実験を行っていないため、NKCC2のエキソサイトーシスにおけるMoesinの役割については、より詳細な解析が必要であると考えられる。

***Msn*^{-/-}マウスでは、尿細管-糸球体フィードバックによるGFRの低下が引き起こされている可能性がある**

本研究により、*Msn*^{-/-}マウスは、野生型マウスと比較して、GFRが低下していることが明らかとなった。TGFのプロセスにおいて、マクラデンサ細胞でのNKCC2を介したNaClの再吸収によるCOX-2の発現調節が重要となる⁷⁰⁾。NKCC2によるNaClの再吸収の亢進がCOX-2の発現の抑制によるPGE₂の産生低下を引き起こし、輸入細動脈の弛緩によるGFRの低下に繋がること示唆されている^{70,71,74)}。本研究では、*Msn*^{-/-}マウスにおいて、腎皮質でCOX-2のmRNAレベル、タンパク質レベルでの発現量の低下およびPGE₂の産生量の低下が認められた。このことから、*Msn*^{-/-}マウスは、アピカル膜上でのNKCC2の高発現によってNaClの再吸収が亢進し、マクラデンサ細胞でのCOX-2の発現低下を介したPGE₂の産生低下を引き起こすことで、TGFによるGFRの低下が起こっている可能性が考えられる。しかしながら、*Msn*^{-/-}マウスにおけるTGFにおける生理学的役割を確かめるには、さらなる検証が必要であると考えられる。

以上、*Msn*^{-/-}マウスでは、NKCC2の細胞膜での脂質ラフトへの局在の障害、エンドサイトーシスの障害が見られ、野生型マウスと比較してアピカル膜上においてNKCC2が貯留していることが明らかとなった。また、*Msn*^{-/-}マウスは、このアピカル膜において過剰発現したNKCC2によって過剰なNaCl再吸収を引き起こし、尿中へのNa⁺およびCl⁻排泄量の低下や高Cl⁻血症といった表現型を呈することが明らかとなった。

【結語】

本研究では、以下の知見を得た。

1. 糸球体において Ezrin は主に足細胞に発現しているが、Ezrin をノックダウンしても糸球体足細胞の形態異常は見られなかった。足細胞においては、正常な足突起を形成することでタンパク質ろ過障壁を構成するのに重要とされる Podocalyxin と Ezrin が複合体を形成することから、*Vil2^{kd/kd}* マウスではタンパク質ろ過機構が障害されることが想定された。しかし、*Vil2^{kd/kd}* マウスの糸球体では Podocalyxin の局在は障害されておらず、タンパク尿も認められなかった。一方で、糸球体障害時には、足突起消失やアルブミン尿などの病態に抵抗性を示すことが明らかとなった。*Vil2^{kd/kd}* マウスでは、足突起の減少を引き起こす Rho GTPase である Rac1 活性の低下および RhoA 活性の上昇が引き起こされており、Ezrin のノックダウンが糸球体障害時の足細胞における形態およびタンパク質ろ過機能異常の軽減に関与する可能性を示した。
2. 尿細管において Moesin は主に近位尿細管および TAL、マクラデンサ細胞のアピカル膜に発現することが明らかとなった。特に TAL では NKCC2 と複合体を形成することで、NKCC2 の脂質ラフトへの移行、エンドサイトーシスによる細胞内への取り込みにおいて重要な役割を担うことが明らかとなった。そのため *Msn^{-/-}* マウスでは、NKCC2 がアピカル膜で過剰発現することで、NaCl の再吸収が亢進し、尿中への Na⁺ および Cl⁻ 排泄量の低下、高 Cl⁻ 血症を呈することが明らかとなった。

以上、筆者は腎臓における ERM タンパク質の生理的な役割について検討を行い、糸球体では Ezrin の発現抑制が糸球体障害時の足細胞足突起の減少およびタンパク質ろ過機能の破壊に保護的に働くことを、TAL では体内の体液調節に重要な働きをもつ電解質再吸収輸送体である NKCC2 のエンドサイトーシスによ

るアピカル膜での発現調節に関わることを明らかにした。

ERM タンパク質は膜輸送タンパク質や足場タンパク質と、Actin 細胞骨格をクロスリンクする細胞骨格関連タンパク質として、その生理機能の解明が試みられてきたが、Ezrin、Radixin、Moesin のそれぞれの機能の違いにおける研究はあまり進展していない。本研究では、Ezrin による Rho GTPase の活性調節における役割や、Moesin の膜タンパク質のエンドサイトーシス制御における役割が明らかとなり、同じ腎臓内でも Ezrin と Moesin とが異なる生理的役割を担っていること、特に Ezrin においては糸球体足細胞でクロスリンカーとしてではなく Rho GTPase の活性制御に寄与していることが明らかとなった。また、Ezrin、Radixin、Moesin それぞれが代償的な機能を担わないことが示唆された。今後、Ezrin、Radixin、Moesin は *in vivo* においても多機能な役割を担うタンパク質として解析していく必要性があり、また本当にそれぞれが冗長性をもって同一の役割を担うのかどうかについて、さらなる研究が必要となるものと考えられる。

本学位論文は、以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

1. **Kawaguchi K**, Hatano R, Matsubara M, Asano S. Internalization of NKCC2 is impaired in thick ascending limb of Henle in moesin knockout mice. *Pflügers Archiv.* **470**(7), 1055-1068, 2018.
2. Hatano R, Takeda A, Abe Y, **Kawaguchi K**, Kazama I, Matsubara M, Asano S. Loss of ezrin expression reduced the susceptibility to the glomerular injury in mice. *Sci. Rep.* **8**(1), 4512, 2018.

【謝辞】

終わりに臨み、本研究を遂行するにあたり、多くのご指導、ご鞭撻を賜りました指導教員である浅野真司教授、ならびに多大なご協力を賜りました波多野亮先生にこの場を借りて心より感謝申し上げます。

また、*Vil2^{kd/kd}* マウスおよび *Msn^{-/-}* マウスを供与いただきました、大阪大学大学院生命機能研究科個体機能学講座の月田早智子教授、田村淳准教授に感謝申し上げます。そして、本研究を行うにあたり、ご高配を賜りました桑原厚和先生、中張隆司先生、立命館大学薬学部分子生理学研究室の皆様をはじめ、お世話になりました多くの方々に深く感謝申し上げます。

なお、本研究の一部は日本学術振興会特別研究員奨励費により、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金にサポートをいただきましたことに謝意を表します。

最後に、博士課程修了まで長年にわたり支えてくれた家族、友人に感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**(4), 276–287, 2010.
- 2) Kawaguchi K, Yoshida S, Hatano R, Asano S. Pathophysiological Roles of Ezrin/Radixin/Moesin Proteins. *Biol. Pharm. Bull.* **40**(4), 381–390, 2017.
- 3) Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J. Biol. Chem.* **274**(49), 34507–34510, 1999.
- 4) Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J. Clin. Invest.* **108**(2), 289–301, 2001.
- 5) Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ, Milgram SL. An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **273**(31), 19797–19801, 1998.
- 6) Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kameyama T, Tsukita S, Takai Y. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J. Biol. Chem.* **272**(37), 23371–23375, 1997.
- 7) Tamura A, Kikuchi S, Hata M, Katsuno T, Matsui T, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S. Achlorhydria by ezrin knockdown: defects in the formation/expansion of apical canaliculi in gastric parietal cells. *J. Cell. Biol.* **169**(1), 21–28, 2005.
- 8) Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, Yonemura S, Yamagishi H, Keppler D, Tsukita S, Tsukita S. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat. Genet.* **31**(3), 320–325, 2002.
- 9) Hirata T, Nomachi A, Tohya K, Miyasaka M, Tsukita S, Watanabe T, Narumiya S. Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte

- homeostasis. *Int. Immunol.* **24**(11), 705–717, 2012.
- 10) Liu X, Yang T, Suzuki K, Tsukita S, Ishii M, Zhou S, Wang G, Cao L, Qian F, Taylor S, Oh MJ, Levitan I, Ye RD, Carnegie GK, Zhao Y, Malik AB, Xu J. Moesin and myosin phosphatase confine neutrophil orientation in a chemotactic gradient. *J. Exp. Med.* **212**(2), 267–280, 2015.
 - 11) Hatano R, Fujii E, Segawa H, Mukaisho K, Matsubara M, Miyamoto K, Hattori T, Sugihara H, Asano S. Ezrin, a membrane cytoskeletal cross-linker, is essential for the regulation of phosphate and calcium homeostasis. *Kidney Int.* **83**(1), 41–49, 2013.
 - 12) Chen YX, Li Y, Wang WM, Zhang W, Chen XN, Xie YY, Lu J, Huang QH, Chen N. Phosphoproteomic study of human tubular epithelial cell in response to transforming growth factor-beta-1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Am. J. Nephrol.* **31**(1), 24–35, 2010.
 - 13) Carmosino M, Rizzo F, Procino G, Zolla L, Timperio AM, Basco D, Barbieri C, Torretta S, Svelto M. Identification of moesin as NKCC2-interacting protein and analysis of its functional role in the NKCC2 apical trafficking. *Biol. Cell.* **104**(11), 658–676, 2012.
 - 14) Doi Y, Itoh M, Yonemura S, Ishihara S, Takano H, Noda T, Tsukita S. Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J. Biol. Chem.* **274**(4), 2315–2321, 1999.
 - 15) Bulger RE, Eknoyan G, Purcell DJ 2nd, Dobyas DC. Endothelial characteristics of glomerular capillaries in normal, mercuric chloride-induced, and gentamicin-induced acute renal failure in the rat. *J. Clin. Invest.* **72**(1), 128–141, 1983.
 - 16) Patrakka J, Tryggvason K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**(1), 164–169, 2010.
 - 17) Tian X, Ishibe S *Nephrol.* Targeting the podocyte cytoskeleton: from pathogenesis to therapy in proteinuric kidney disease. *Dial. Transplant.* **31**(10), 1577–1583, 2016.
 - 18) Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in

- the rat and mouse. *J. Cell. Biol.* **60**(2), 423–433, 1974.
- 19) Endlich N, Simon O, Göpferich A, Wegner H, Moeller MJ, Rumpel E, Kotb AM, Endlich K. Two-photon microscopy reveals stationary podocytes in living zebrafish larvae. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**(4), 681–686, 2014.
 - 20) Hackl MJ, Burford JL, Villanueva K, Lam L, Suszták K, Schermer B, Benzing T, Peti-Peterdi J. Tracking the fate of glomerular epithelial cells in vivo using serial multiphoton imaging in new mouse models with fluorescent lineage tags. *Nat. Medl.* **19**(12), 1661–1666, 2013.
 - 21) Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—nephrin—is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* **1**(4), 575–582, 1998.
 - 22) Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(14), 7962–7967, 1999.
 - 23) Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* **24**(4), 349–354, 2000.
 - 24) Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Sakai T, Shimizu F. Cloning of rat homologue of podocin: expression in proteinuric states and in developing glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**(1), 46–56, 2003.
 - 25) Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J. Clin. Invest.* **108**(11), 1621–1629, 2001.
 - 26) Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science.*

- 286**(5438), 312–315, 1999.
- 27) Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, Mathur BN, Turner CA, Geske R, Montgomery CA, Starbuck M, Brandt M, Gupta A, Ramirez-Solis R, Zambrowicz BP, Powell DR. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol. Cell Biol.* **21**(14), 4829–4836, 2001.
- 28) Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC, Jaenisch R. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development.* **112**(11), 3537–3547, 1996.
- 29) Sachs N, Kreft M, van den Bergh Weerman MA, Beynon AJ, Peters TA, Weening JJ, Sonnenberg A. Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *J. Cell Biol.* **175**(1), 33–39, 2006.
- 30) Regele HM, Fillipovic E, Langer B, Poczewki H, Kraxberger I, Bittner RE, Kerjaschki D. Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**(3), 403–412, 2000.
- 31) Nielsen JS McNagny KM. The role of podocalyxin in health and disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**(8), 1669–1676, 2009.
- 32) Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C, Merkens H, Chelliah S, Graf T, McNagny KM. Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J. Exp. Med.* **194**(1), 13–27, 2001.
- 33) Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int.* **58**(4), 1797–1804, 2000.
- 34) Sun YB, Qu X, Zhang X, Caruana G, Bertram JF, Li J. Glomerular endothelial cell injury and damage precedes that of podocytes in adriamycin-induced nephropathy. *PLoS One.* **8**(1), e55027, 2013.
- 35) Mouawad F, Tsui H, Takano T. Role of Rho-GTPases and their regulatory proteins in

- glomerular podocyte function. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **91**(10), 773–782, 2013.
- 36) Blattner SM, Hodgins JB, Nishio M, Wylie SA, Saha J, Soofi AA, Vining C, Randolph A, Herbach N, Wanke R, Atkins KB, Gyung Kang H, Henger A, Brakebusch C, Holzman LB, Kretzler M. Divergent functions of the Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in podocyte injury. *Kidney Int.* **84**(5), 920–930, 2013.
- 37) Kistler AD, Altintas MM, Reiser J. Podocyte GTPases regulate kidney filter dynamics. *Kidney Int.* **81**(11), 1053–1055, 2012.
- 38) Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita S, Tsukita S. Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J. Cell Biol.* **135**(1), 37–51, 1996.
- 39) Cunningham R, Esmaili A, Brown E, Biswas RS, Murtazina R, Donowitz M, Dijkman HB, van der Vlag J, Hogema BM, De Jonge HR, Shenolikar S, Wade JB, Weinman EJ. Urine electrolyte, mineral, and protein excretion in NHERF-2 and NHERF-1 null mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**(4), F1001–F1007, 2008.
- 40) Kang HG, Lee M, Lee KB, Hughes M, Kwon BS, Lee S, McNagny KM, Ahn YH, Ko JM, Ha IS, Choi M, Cheong HI. Loss of podocalyxin causes a novel syndromic type of congenital nephrotic syndrome. *Exp. Mol. Med.* **49**(12), e414, 2017.
- 41) Roselli S, Heidet L, Sich M, Henger A, Kretzler M, Gubler MC, Antignac C. Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* **24**(2), 550–560, 2004.
- 42) Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J. Clin. Invest.* **112**(2), 209–221, 2003.
- 43) Pozzi A, Jarad G, Moeckel GW, Coffa S, Zhang X, Gewin L, Eremina V, Hudson BG, Borza DB, Harris RC, Holzman LB, Phillips CL, Fassler R, Quaggin SE, Miner JH, Zent R. Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. *Dev. Biol.* **316**(2), 288–301, 2008.

- 44) Orlando RA, Takeda T, Zak B, Schmieder S, Benoit VM, McQuistan T, Furthmayr H, Farquhar MG. The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**(8), 1589–1598, 2001.
- 45) Scott RP, Hawley SP, Ruston J, Du J, Brakebusch C, Jones N, Pawson T. Podocyte-specific loss of Cdc42 leads to congenital nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**(7), 1149–1154, 2012.
- 46) Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawarazaki W, Kurihara H, Tanaka H, Miyoshi J, Takai Y, Fujita T. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat. Med.* **14**(12), 1370–1376, 2008.
- 47) Babelova A, Jansen F, Sander K, Löhn M, Schäfer L, Fork C, Ruetten H, Plettenburg O, Stark H, Daniel C, Amann K, Pavenstädt H, Jung O, Brandes RP. Activation of Rac-1 and RhoA contributes to podocyte injury in chronic kidney disease. *PLoS One.* **8**(11), e80328, 2013.
- 48) Sun Y, Guo C, Ma P, Lai Y, Yang F, Cai J, Cheng Z, Zhang K, Liu Z, Tian Y, Sheng Y, Tian R, Deng Y, Xiao G, Wu C. Kindlin-2 Association with Rho GDP-Dissociation Inhibitor α Suppresses Rac1 Activation and Podocyte Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**(12), 3545–3562, 2017.
- 49) Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell Biol.* **147**(5), 1009–1022, 1999.
- 50) Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**(8), 586–599, 2002.
- 51) Khadeer MA, Tang Z, Tenenhouse HS, Eiden MV, Murer H, Hernando N, Weinman EJ, Chellaiah MA, Gupta A. Na⁺-dependent phosphate transporters in the murine osteoclast: cellular distribution and protein interactions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**(6), C1633–1644, 2003.

- 52) Mahon MJ. Ezrin promotes functional expression and parathyroid hormone-mediated regulation of the sodium-phosphate cotransporter 2a in LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**(3), F667–675, 2008.
- 53) Nomachi A, Yoshinaga M, Liu J, Kanchanawong P, Tohyama K, Thumkeo D, Watanabe T, Narumiya S, Hirata T. Moesin controls clathrin-mediated S1PR1 internalization in T cells. *PLoS One.* **8**(12), e82590, 2013.
- 54) Barroso-González J, Machado JD, García-Expósito L, Valenzuela-Fernández A. Moesin regulates the trafficking of nascent clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* **284**(4), 2419–2434, 2009.
- 55) Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **301**(6), F1143–F1159, 2011.
- 56) Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat. Genet.* **13**(2), 183–188, 1996.
- 57) Takahashi N, Chernavvsky DR, Gomez RA, Igarashi P, Gitelman HJ, Smithies O. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**(10), 5434–5439, 2000.
- 58) Aviv A1, Hollenberg NK, Weder A. Urinary potassium excretion and sodium sensitivity in blacks. *Hypertension*, **43**(4), 707–713, 2004.
- 59) Jung J, Basile DP, Pratt JH. Sodium reabsorption in the thick ascending limb in relation to blood pressure: a clinical perspective. *Hypertension*, **57**(5), 873–879, 2011.
- 60) Molony DA, Reeves WB, Hebert SC, Andreoli TE. ADH increases apical Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle. *Am. J. Physiol.* **252**(1), F177–F187, 1987.
- 61) Dublineau I, Pradelles P, de Rouffignac C, Elalouf JM. Differential short-term desensitization to vasopressin, isoproterenol, glucagon, parathyroid hormone and calcitonin in the thick ascending limb of rat kidney. *Pflügers Archiv.* **420**(1), 16–22, 1992.

- 62) Neant F, Bailly C. Luminal and intracellular cGMP inhibit the mTAL reabsorptive capacity through different pathways. *Kidney Int.* **44**(4), 741–746, 1993.
- 63) Bailly C. Effect of luminal atrial natriuretic peptide on chloride reabsorption in mouse cortical thick ascending limb: inhibition by endothelin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**(10), 1791–1797, 2000.
- 64) Ares GR, Caceres P, Alvarez-Leefmans FJ, Ortiz PA. cGMP decreases surface NKCC2 levels in the thick ascending limb: role of phosphodiesterase 2 (PDE2). *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **295**(4), F877–F887, 2008.
- 65) Gunaratne R, Braucht DW, Rinschen MM, Chou CL, Hoffert JD, Pisitkun T, Knepper MA. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals cAMP/vasopressin-dependent signaling pathways in native renal thick ascending limb cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**(35), 15653–15658, 2010.
- 66) Caceres PS, Mendez M, Ortiz PA. Vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2) but Not VAMP3 mediates cAMP-stimulated trafficking of the renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC2 in thick ascending limbs. *J. Biol. Chem.* **289**(34), 23951–23962, 2014.
- 67) Ares GR, Ortiz PA. Dynamin2, clathrin, and lipid rafts mediate endocytosis of the apical Na/K/2Cl cotransporter NKCC2 in thick ascending limbs. *J. Biol. Chem.* **287**(45), 37824–37834, 2012.
- 68) Ares GR, Ortiz PA. Constitutive endocytosis and recycling of NKCC2 in rat thick ascending limbs. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **299**(5), F1193–F1202, 2010.
- 69) Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat. Cell Biol.* **4**(3), 191–197, 2002.
- 70) Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am. J. Physiol.* **274**(2), R263–279, 1998.
- 71) Deng A, Wead LM, Blantz RC. Temporal adaptation of tubuloglomerular feedback: effects of COX-2. *Kidney Int.* **66**(6), 2348–2353, 2004.

- 72) Welker P, Böhlick A, Mutig K, Salanova M, Kahl T, Schlüter H, Blottner D, Ponce-Coria J, Gamba G, Bachmann S. Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**(3), F789–F802, 2008.
- 73) Yu MJ, Pisitkun T, Wang G, Aranda JF, Gonzales PA, Tchapyjnikov D, Shen RF, Alonso MA, Knepper MA. Large-scale quantitative LC-MS/MS analysis of detergent-resistant membrane proteins from rat renal collecting duct. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**(3), C661–C678, 2008.
- 74) Araujo M, Welch WJ. Cyclooxygenase 2 inhibition suppresses tubuloglomerular feedback: roles of thromboxane receptors and nitric oxide. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **296**(4), F790–F794, 2009.

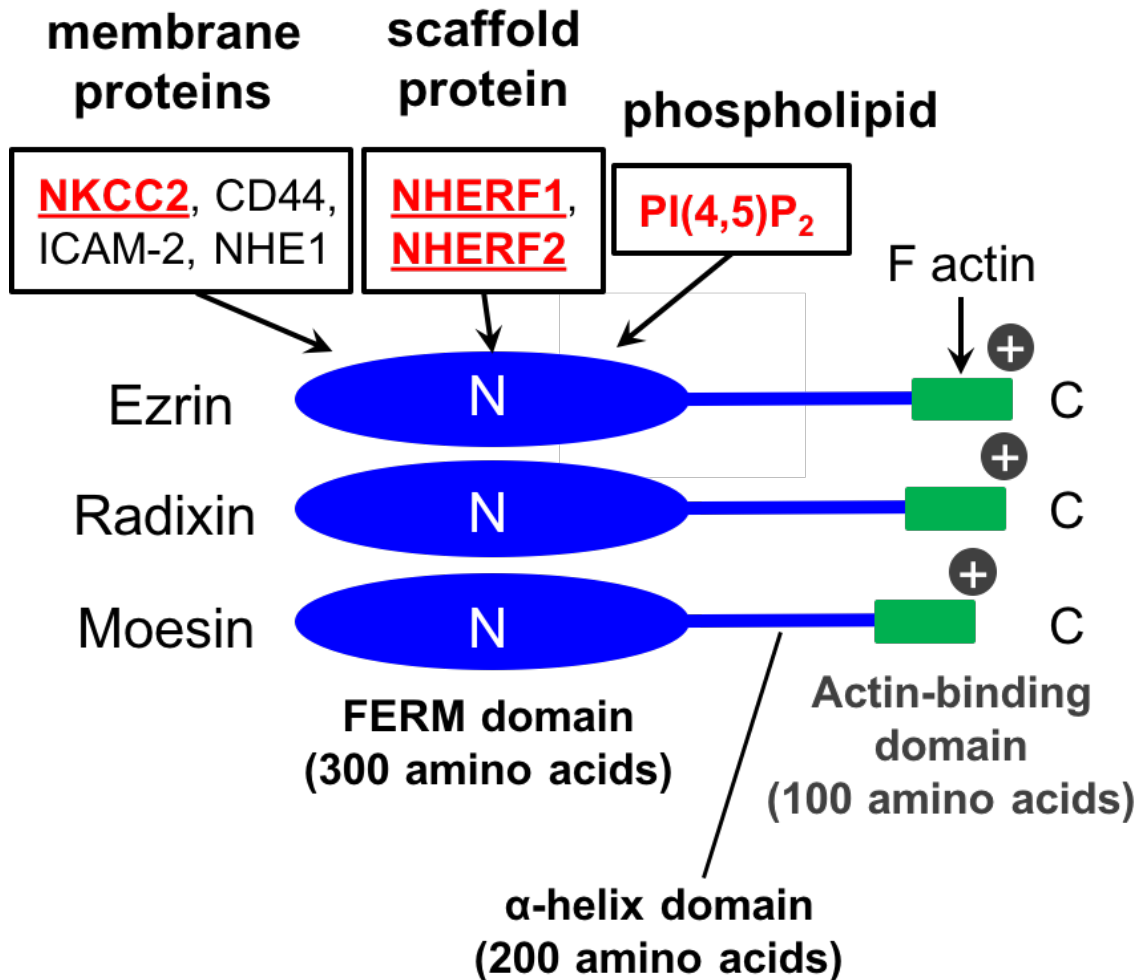


Fig. 1 Schematic Figure of ERM Proteins.

The FERM domain and actin-binding domain are located at the amino- and carboxy-terminal of ERM proteins, respectively. The FERM domain consisted of about 300 amino acids binds to membrane proteins such as NKCC2, CD44, ICAM-2 and NHE1, and membrane phospholipid PI(4,5)P₂.

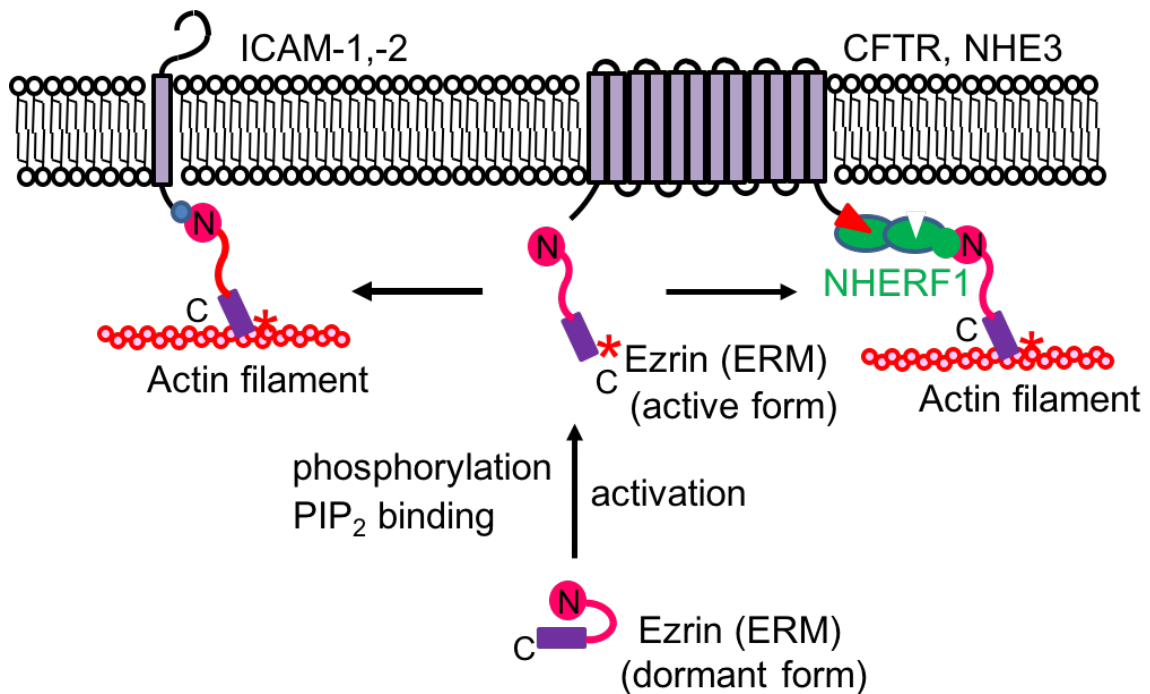


Fig. 2 ERM Proteins Function as Cross-Linkers between Membrane Proteins and Actin Filaments Directly or Indirectly *via* the Scaffold Proteins.

The interaction between the amino- and carboxy-terminal domains of ERM proteins makes them dormant. Phosphorylation of Thr⁵⁶⁷ in ezrin (Thr⁵⁶⁴ in radixin or Thr⁵⁵⁸ in moesin) by Rho kinase or protein kinase C, or PIP₂ binding to the FERM domain, opens up the dormant conformation into the active open conformation. (Left half) ERM proteins directly cross-link between ICAM-1 or -2 and actin filaments. (Right half) ERM proteins cross-link between the CFTR or NHE3 and actin filaments indirectly via the scaffold protein NHERF1.

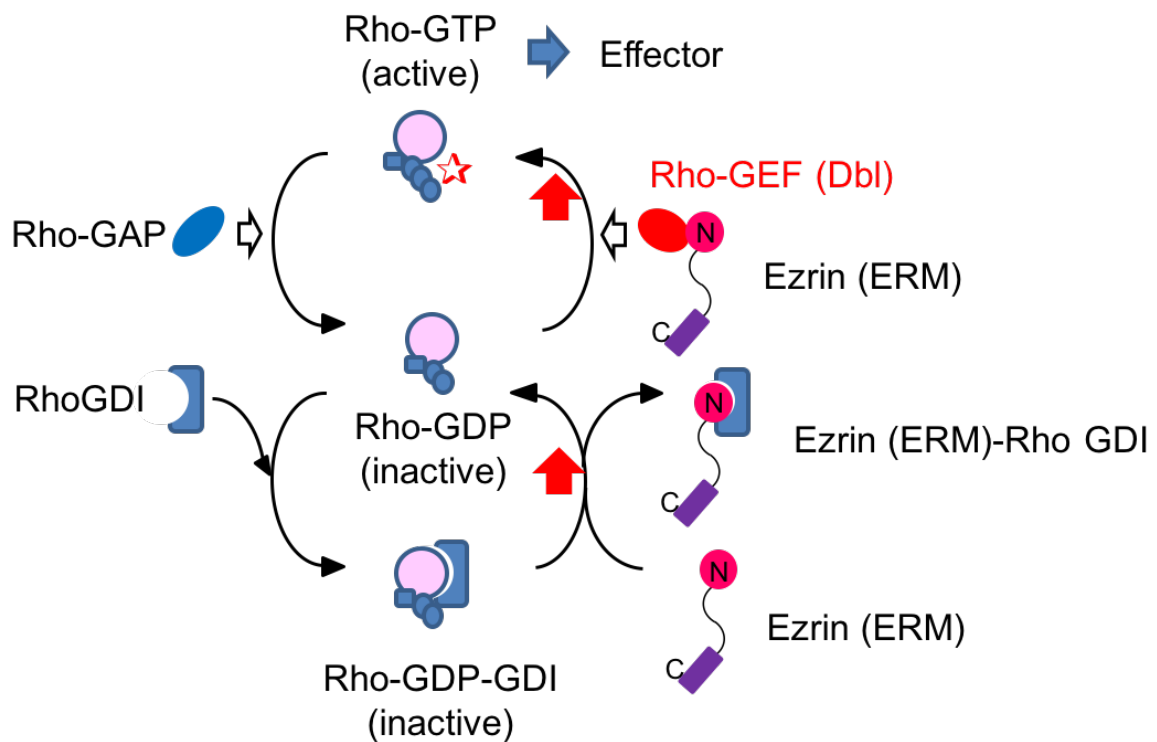


Fig. 3 Regulation of Rho GTPases by Ezrin (ERM Proteins).

Rho GTPases in the GTP-bound form are active and interact with downstream effectors. They have an intrinsic GTPase activity and catalyze the conversion of bound GTP to GDP. The GDP-bound Rho GTPases are inactive and have greatly reduced affinity for downstream effectors. Rho-GEFs (such as Dbl) induce the exchange of bound GDP for GTP and activate Rho GTPases. On the other hand, Rho-GAPs inactivate Rho GTPases by increasing their intrinsic GTPase activity, resulting in accelerated hydrolysis of GTP to GDP. Rho-GDIs interact to stabilize the inactive GDP-bound Rho GTPases. Ezrin (or ERM proteins) promotes the dissociation of Rho-GDI from Rho GTPases. ERM proteins also function as a binding protein of GEF (Dbl) to activate Rho GTPases.

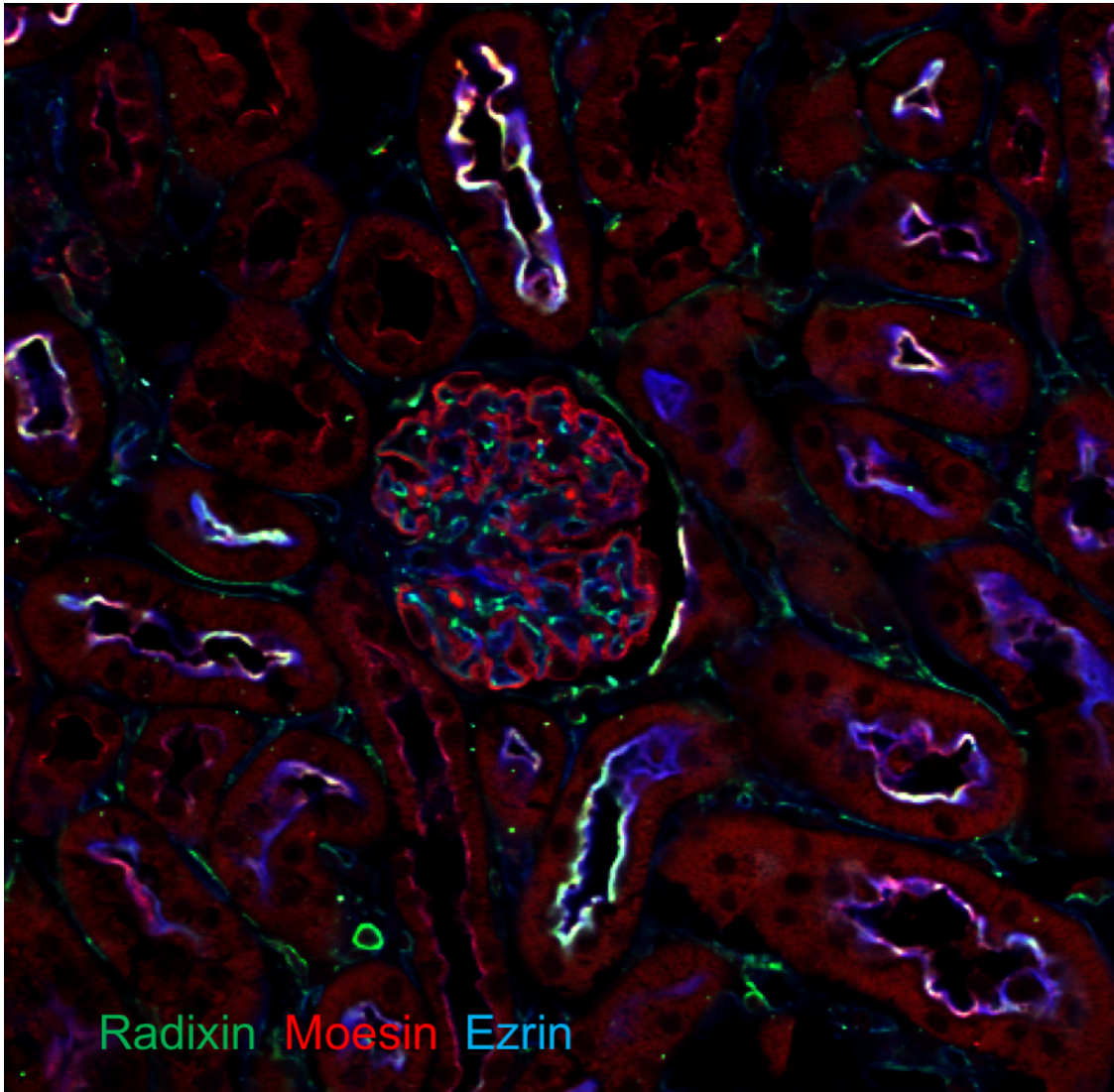


Fig. 4 Distributions of ERM Proteins in Mouse Kidney.

In glomeruli, ezrin was exclusively detected in podocytes; radixin and moesin were detected in endothelial cells. In addition, radixin and moesin co-localised with ezrin in the apical membranes of the proximal tubules (green: radixin, red: ezrin and blue: moesin).

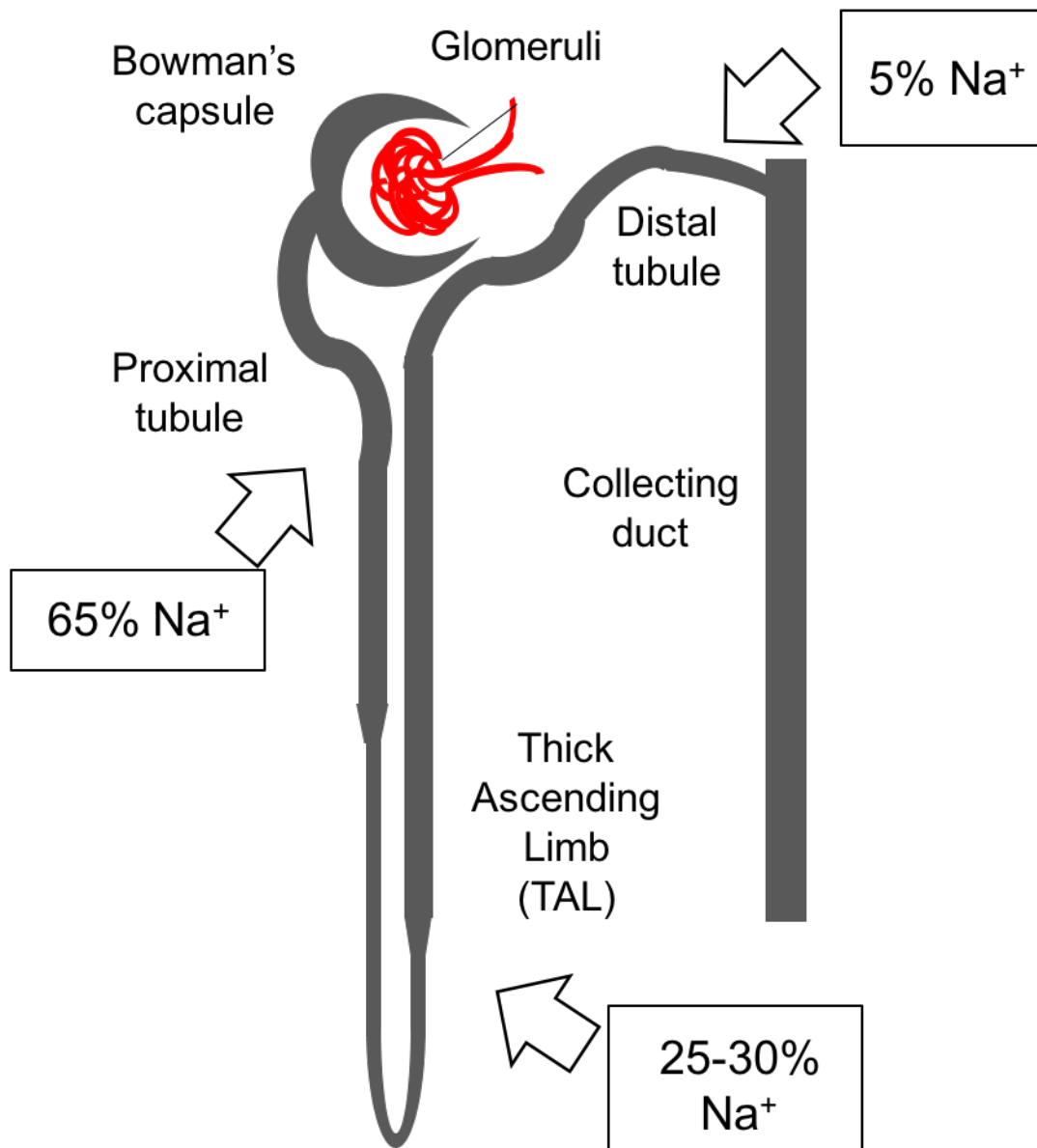


Fig.5 Na^+ Reabsorption at Different Parts of the Nephron.

In the renal tubule, 65%, 25–30%, 5% of Na^+ filtered through the glomeruli are reabsorbed in proximal tubule, thick ascending limb (TAL), and distal tubule, respectively.

Table 1 Primer Sequences Used for Genotyping and Real-time PCR.

Use	Gene	Forward (Fw) or Reverse (Rv)	Primer sequence
for genotyping	<i>Vil2^{kd/kd}</i> mice	Fw (EK29)	5'-GTGTGGCACTCTGCCTTCAAG-3'
		Rv (Geno-A1)	5'-CATGGTGCCACACAGGACTC-3'
		Rv (En2-A)	5'-AGCGGATCTCAAACCTCTCCTC-3'
	<i>Msn^{-/-}</i> mice	Fw (GF1)	5'-CTGAAGTCGGACAAAGATTTCCAGG-3'
		Fw (GF2)	5'-CATCAGTATATGAAACAGCCCCCTG-3'
		Rv (GRv)	5'-AGGTGTCTCCCAGAGATACGATTTGG-3'
for Real-time PCR	COX-2	Fw	5'-TGGTTACAAAAGCTGGGAAGC-3'
		Rv	5'-ATGGGAGTTGGGCAGTCATC-3'
	GAPDH	Fw	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
		Rv	5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

Table 2 Antibodies Used in This Study.

Antigen	Source	Species (Clone)	Dilution (Application)
Ezrin	LifeSpan Bioscience	Mouse	1:1000 (WB) 1: 100 (IF)
ERM	Cell Signaling Technology	Rabbit	1:1000 (WB)
β -actin	Cell Signaling Technology	Rabbit	1:5000 (WB)
Rho-GDI α	Sigma	Goat	1: 1000 (WB)
Radixin	Abcam	Rabbit	1:100 (IF)
Moesin	Abcam	Rabbit	1: 100 (IF)
Moesin	Gift from Dr. Tsukita	Mouse (2287)	1: 200 (WB)
podocin	Abcam	Rabbit	1: 100 (IF)
synaptopodin	Abcam	Mouse	1: 100 (IF)
NHERF2	Thermo Fisher Scientific	Rabbit	1: 1000 (WB) 1:100 (IF)
Podocalyxin	R & D systems	Goat	1: 1000 (WB) 1:100 (IF)
NKCC2	Our group previously generated	Rabbit	1: 500 (WB) 1:100 (IF)
THP	Santa Cruz Biotechnology	Goat	1: 1000 (WB) 1:100 (IF)
AQP2	Alomone Labs	Rabbit	1: 1000 (WB) 1:100 (IF)
ROMK	Alomone Labs	Rabbit	1: 1000 (WB) 1:100 (IF)
Megalin	Sigma	Rabbit	1:100 (IF)
GAPDH	Cell Signaling Technology	Rabbit (14C10)	1: 1000 (WB)
Rab11	BD Biosciences	Mouse	1: 1000 (WB)
Rab5	Cell Signaling Technology	Rabbit	1: 1000 (WB)
Flotillin-2	Sigma	Rabbit	1: 1000 (WB)

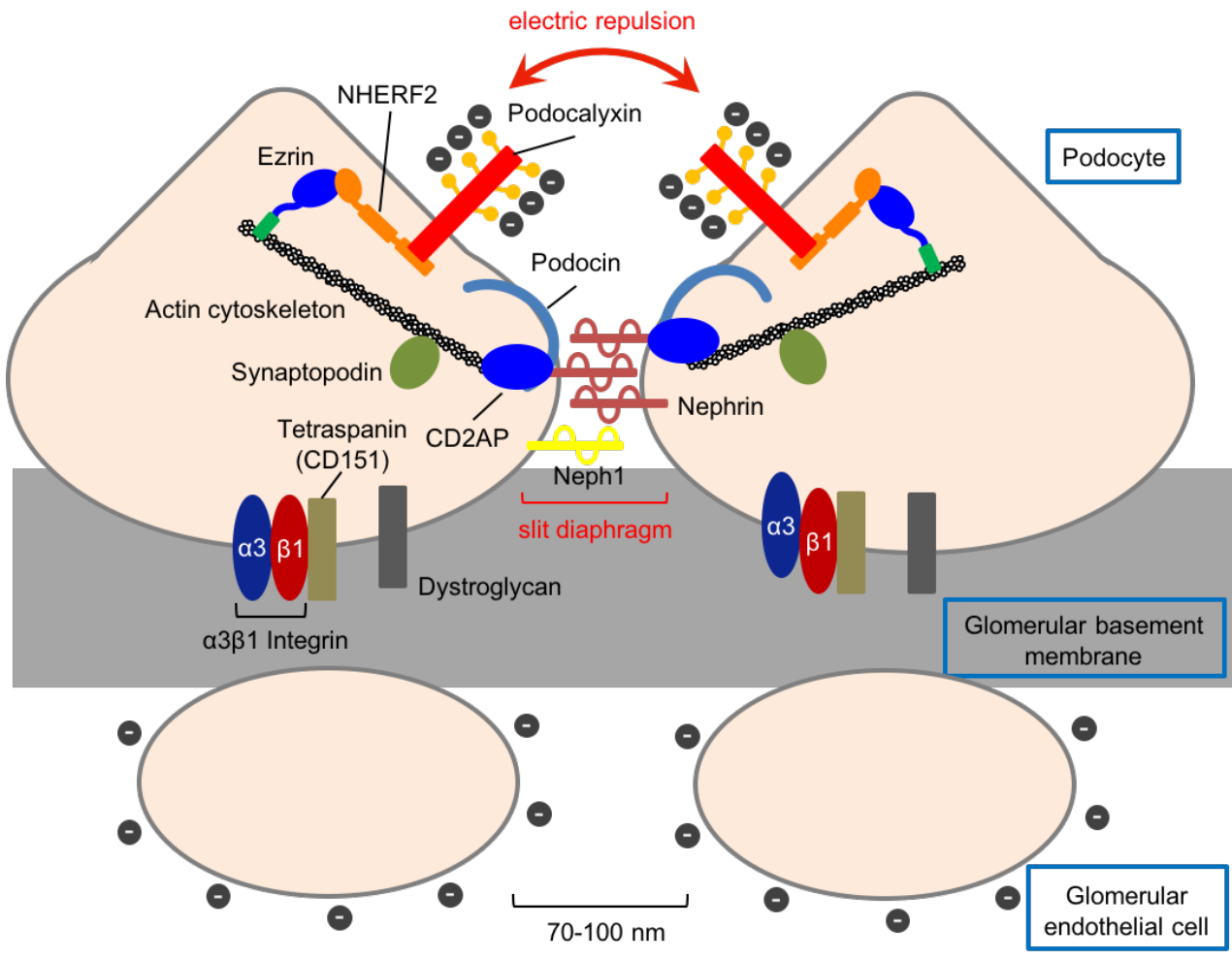


Fig. 6 Schematic Figure of Glomerular Structure and Podocyte Foot Process.

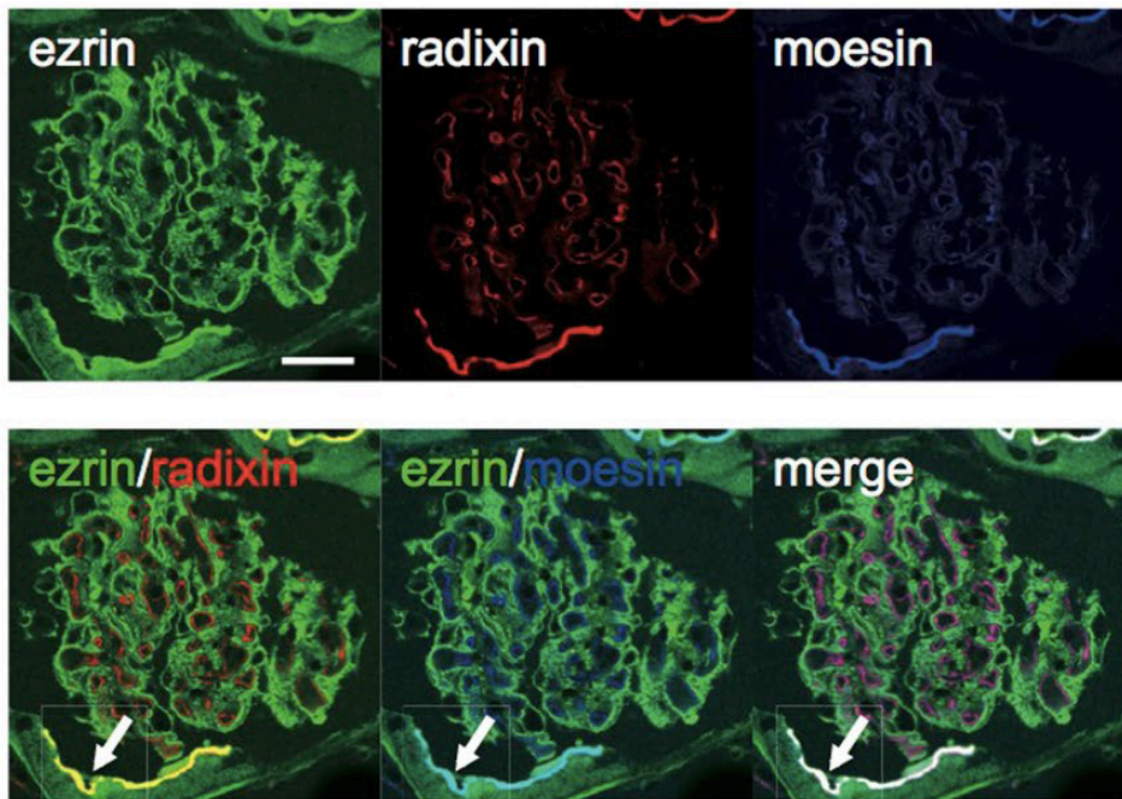


Fig. 7 Distributions of ERM Proteins in Mouse Glomeruli.

In WT mouse kidneys, glomerular localization of ERM proteins was investigated by immunofluorescence analysis. Ezrin, radixin and moesin showed different localization in glomeruli. Ezrin was exclusively detected in podocytes; radixin and moesin were detected in endothelial cells, but not podocytes. Radixin and moesin co-localized with ezrin in the apical membranes of the proximal tubules (Arrow).

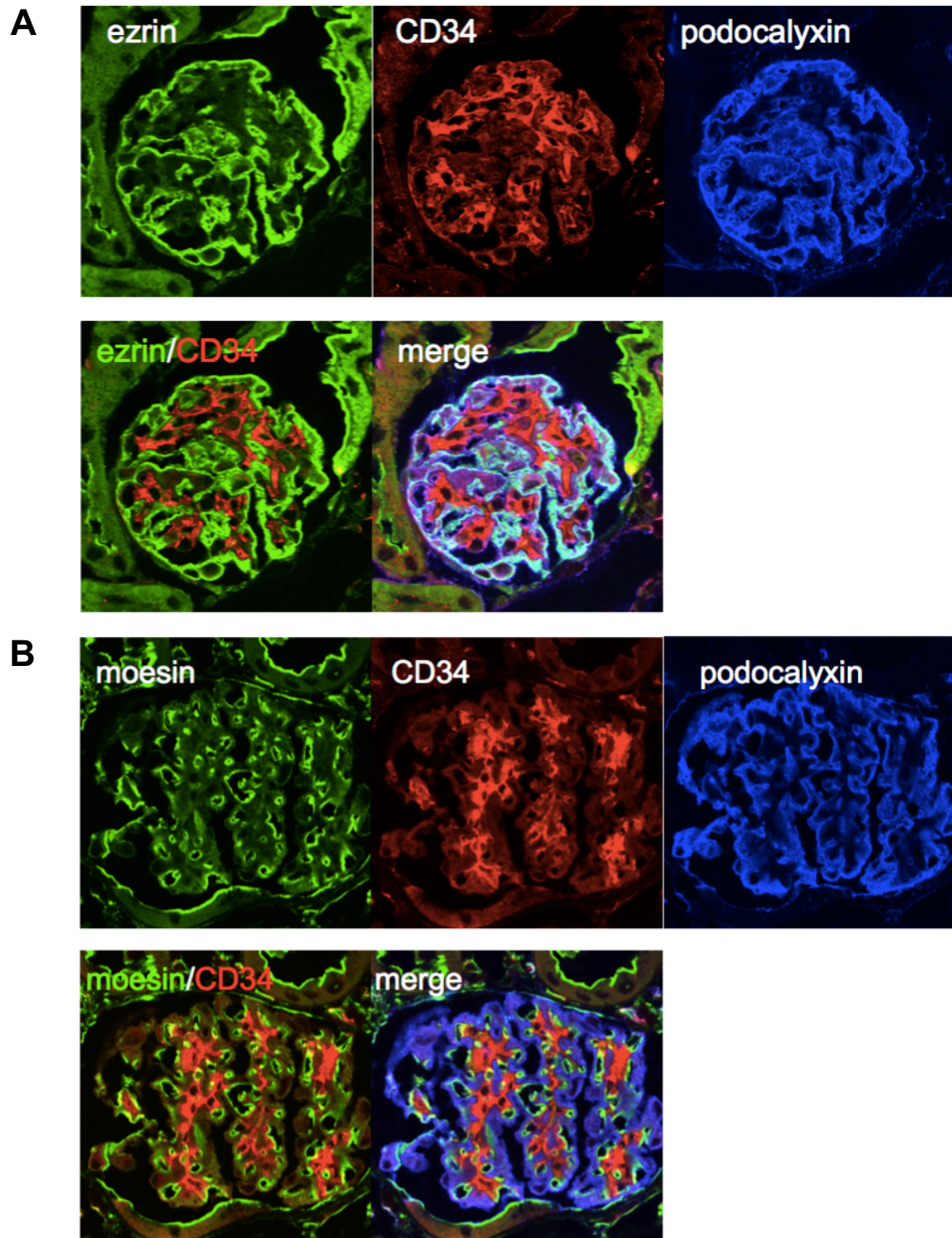


Fig. 8 Immunofluorescent Analysis for Ezrin and Moesin in Glomeruli.

Coimmunofluorescent analysis for ezrin (**A**) and moesin (**B**) with CD34, an endothelial cell marker, and podocalyxin, a podocyte marker were performed in WT mice kidney. Ezrin was detected in podocytes. On the contrary, moesin was detected in endothelial cells but not podocytes.

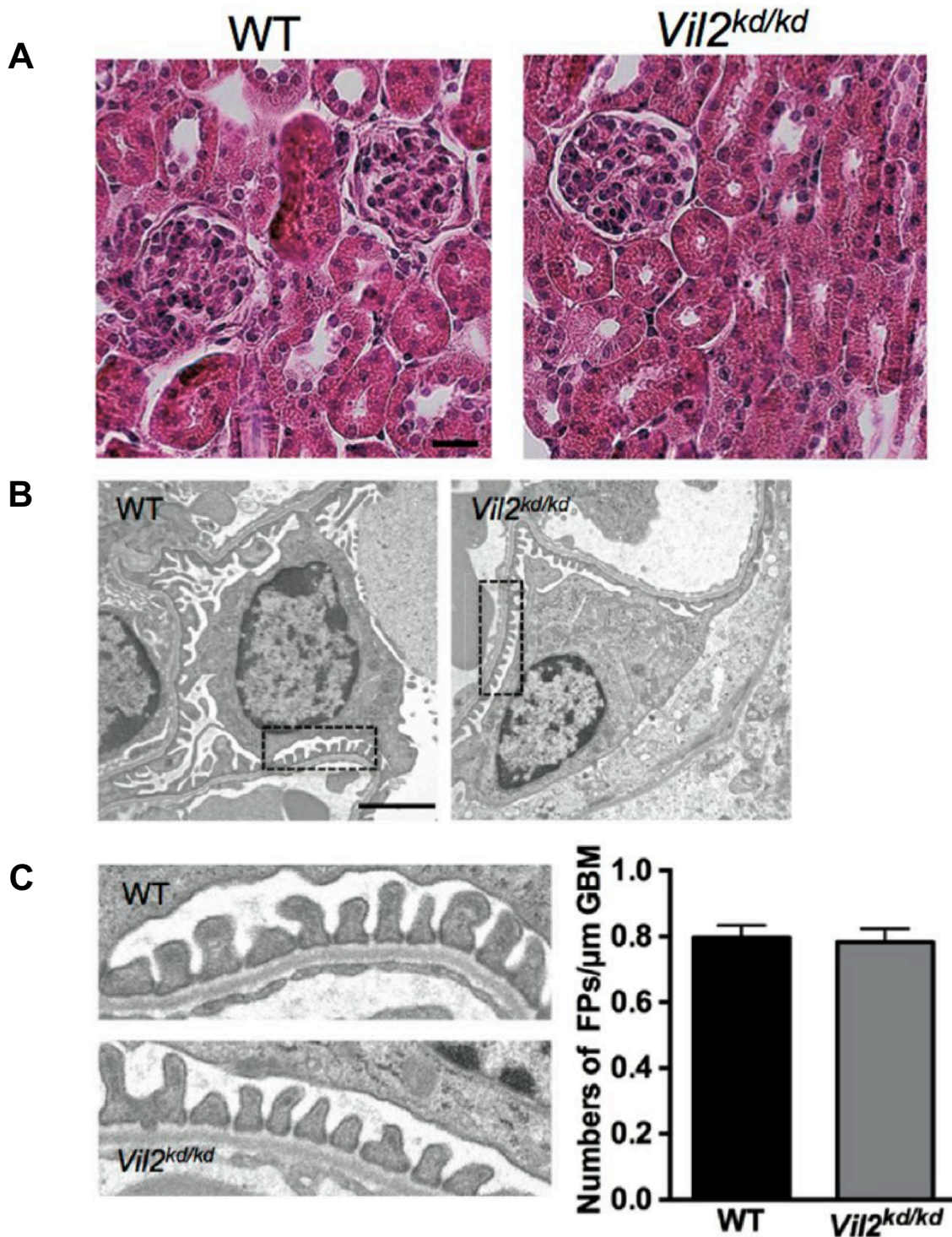


Fig. 9 Histological Analysis of *Vil2^{kd/kd}* Mouse Glomeruli.

There were no morphological abnormalities in the *Vil2^{kd/kd}* glomeruli observed by H.E. staining (Scale bar: 25 μm) (A) or electron microscopic analysis (magnification × 3,610, scale bar: 2 μm) (B). Areas enclosed by dotted lines are magnified, and (magnification × 19,000) were shown in (C) and the number of foot processes/μm of glomerular basement membrane (GBM) was counted right graph).

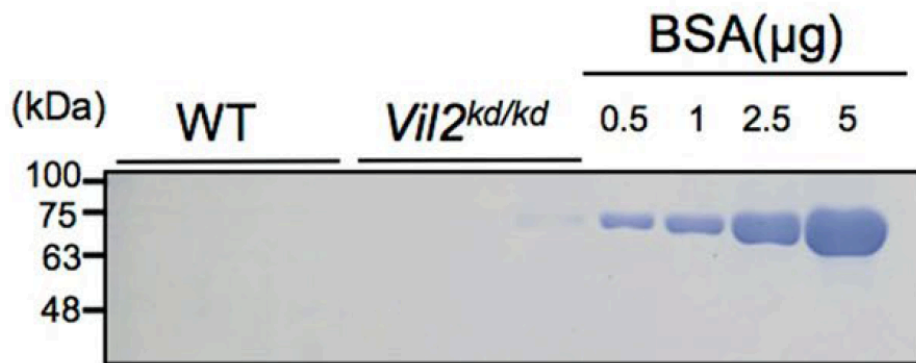


Fig. 10 Spot Urine was Separated by SDS-PAGE and Stained with CBB.
As a positive control, BSA (0.5, 1, 2.5 and 5 μg) was loaded. Apparent urinary albumin leakage was not observed in WT and *Vil2^{kd/kd}* mouse urine.

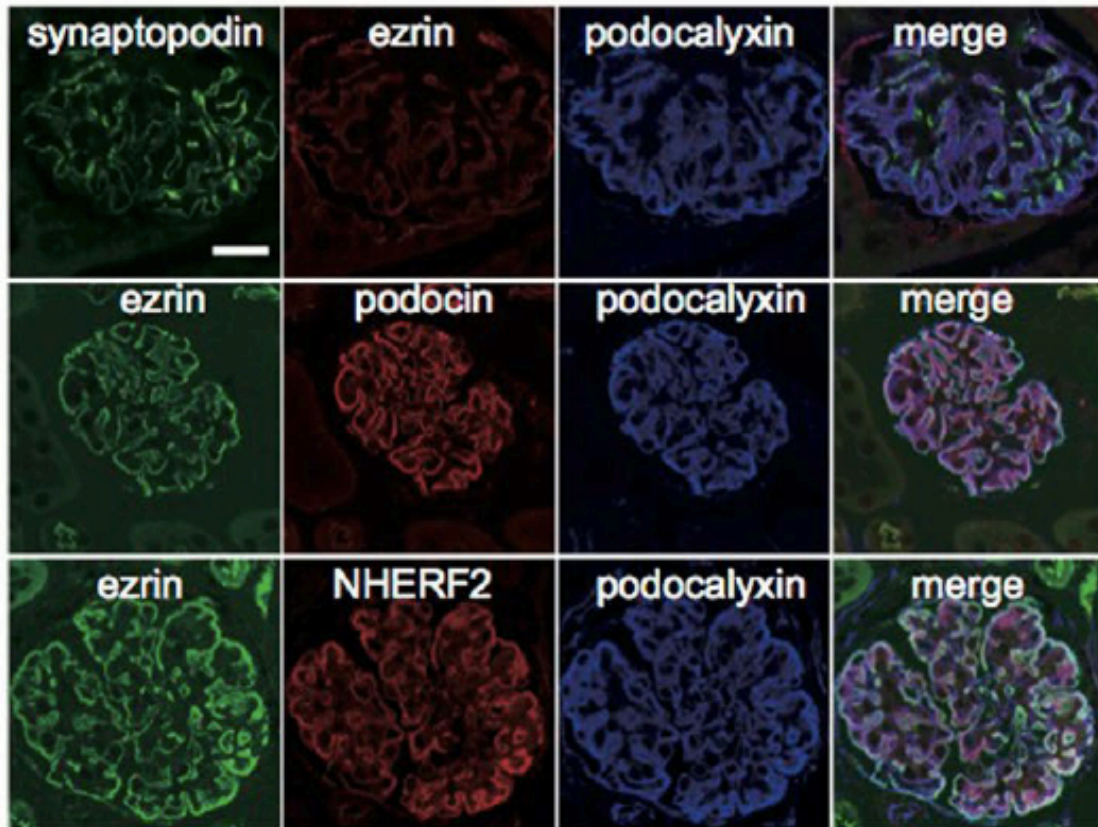


Fig. 11 Immunofluorescence Analysis for Proteins Expressed in Glomerular Podocytes in WT Mice Glomeruli.

Immunolocalization of ezrin, other related proteins (NHERF2 and podocalyxin), and marker proteins (synaptopodin and podocin) was investigated in WT mouse glomeruli (Scale bar: 20 μ m).

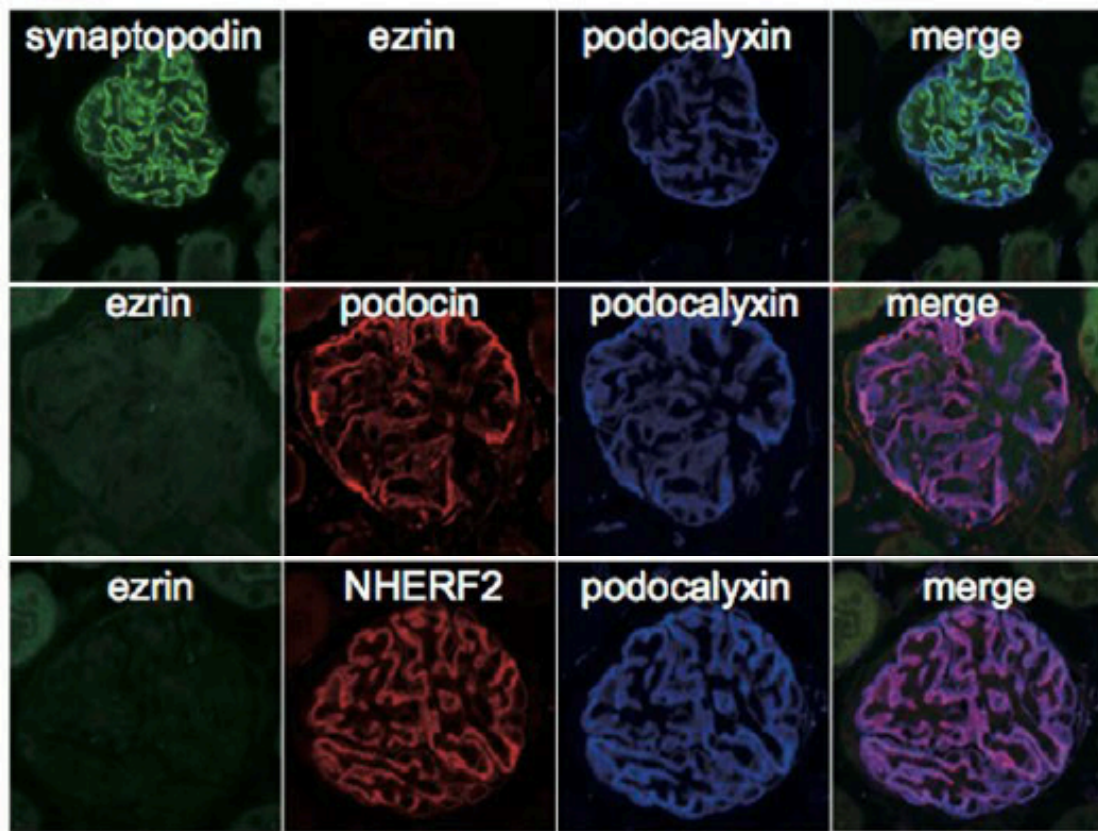
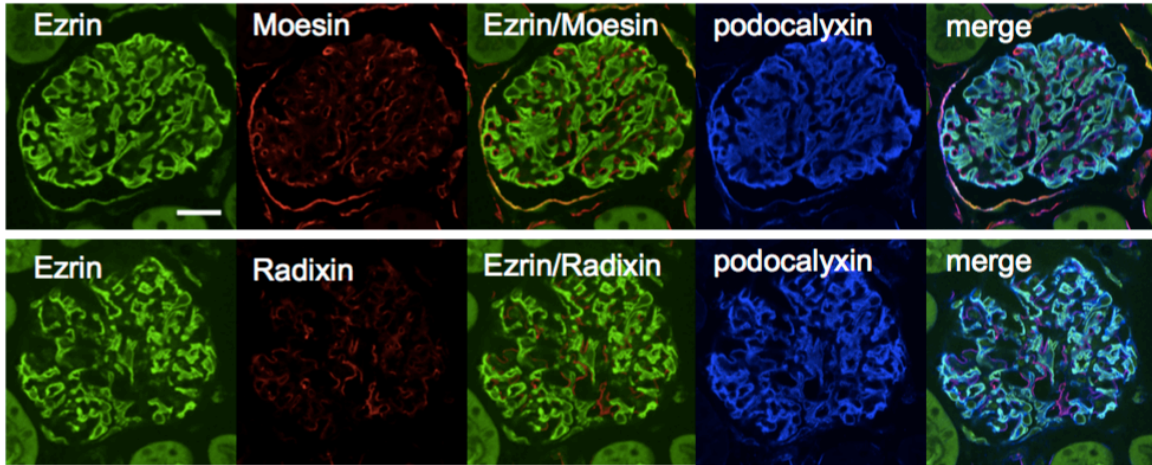


Fig. 12 Immunofluorescence Analysis for Proteins Expressed in Glomerular Podocytes in *Vil2^{kd/kd}* Mice Glomeruli.

Immunolocalization of ezrin, other related proteins (NHERF2 and podocalyxin), and marker proteins (synaptopodin and podocin) was investigated in *Vil2^{kd/kd}* mouse glomeruli.

A



B

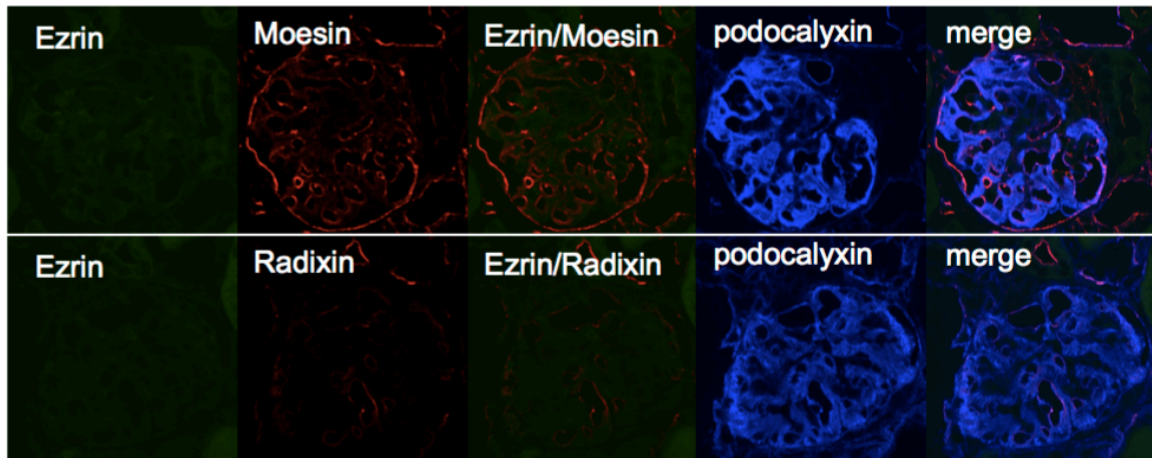


Fig. 13 Immunofluorescent Analysis for ERM Proteins in WT and *Vil2^{kd/kd}* Mice Glomeruli.

Localizations of radixin and moesin were also investigated in WT (A) and *Vil2^{kd/kd}* (B) mouse glomeruli. Ezrin, radixin, and moesin were coimmunostained with podocalyxin.

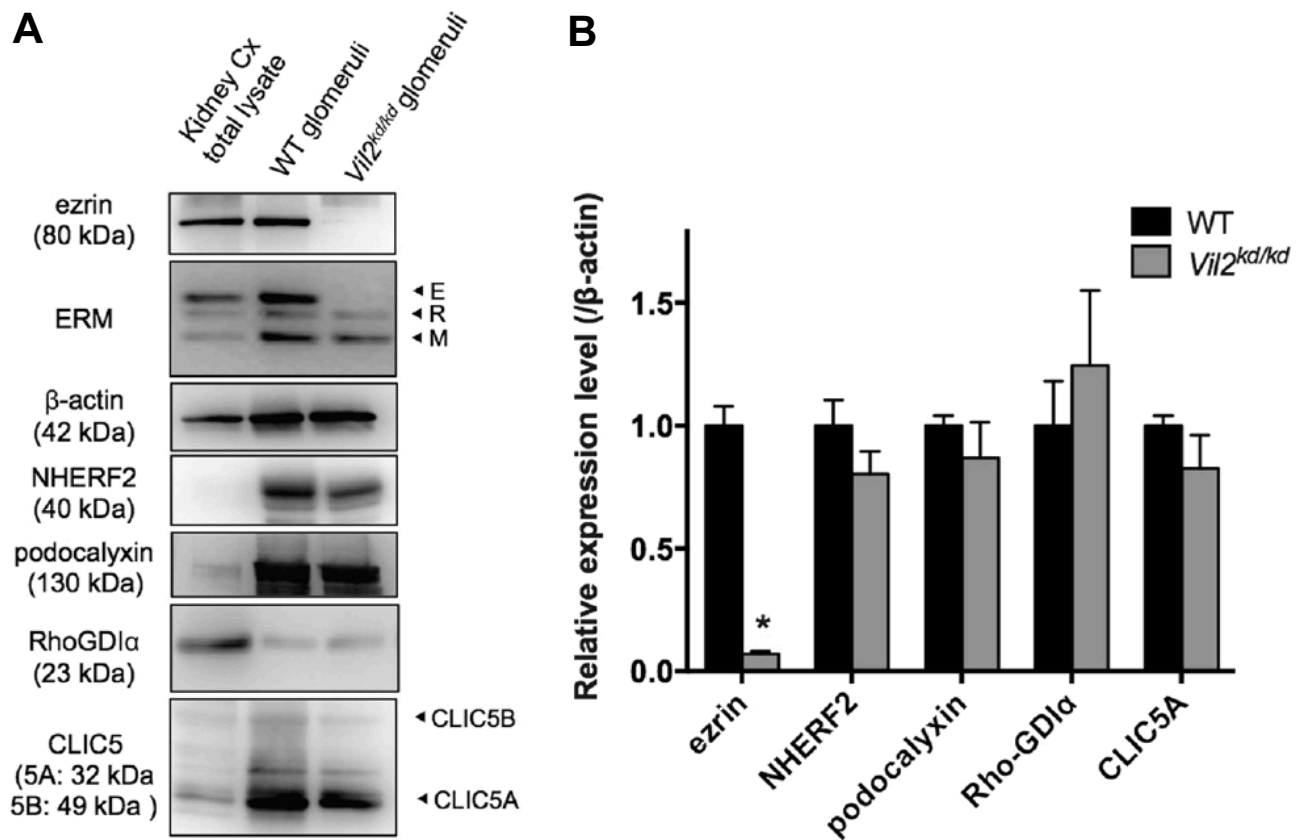


Fig. 14 Western Blot Analysis of Glomerular Proteins in Isolated Glomeruli from WT and *Vil2^{kd/kd}* Mice.

Glomerular protein expression levels were investigated by immunoblotting. As a control, total kidney cortex lysate from WT mouse was used (A). Densitometric analysis was performed (n = 3–5, respectively) (B). * $p < 0.05$, vs. WT.

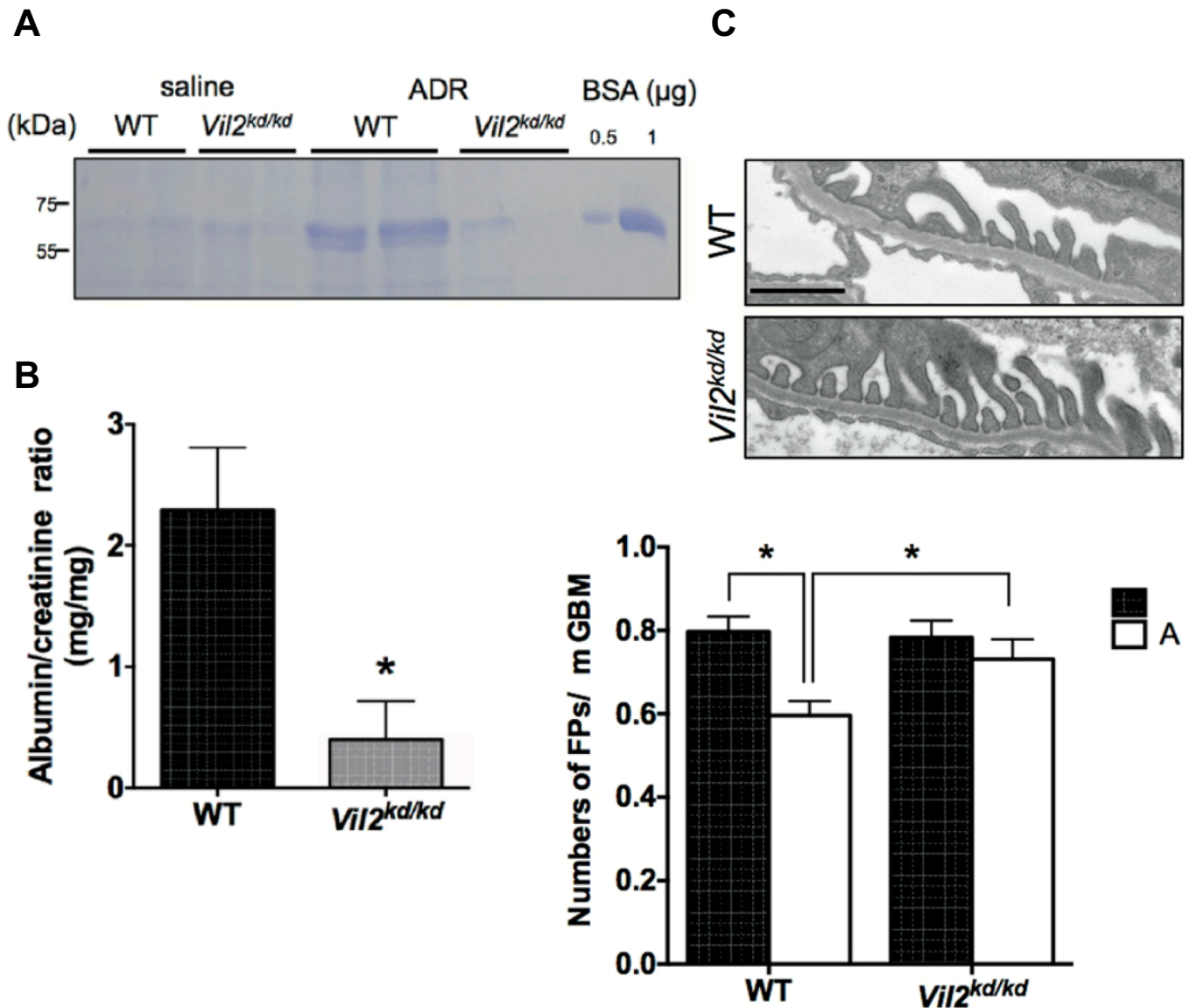


Fig. 15 Morphological Changes in Podocytes and Functional Changes in Adriamycin-induced Glomerulopathy.

Adriamycin (50 mg/kg) was administered intravenously. After 7 days, spot urine was collected, separated by SDS-PAGE and stained with CBB. As a positive control, BSA (0.5 and 1 μg) was loaded. Urinary albumin excretion was increased in WT mice but not *Vil2^{kd/kd}* mice (WT: n = 7, *Vil2^{kd/kd}*: n = 7) (A). Urinary albumin and creatinine concentrations were measured and ACR (mg albumin/mg creatinine) was calculated (B). Electron microscopic analysis was performed in these mice (magnification \times 19,000, Scale bar: 1 μm). Number of foot processes/ μm of GBM was measured. Foot process effacement was significantly progressed in WT mice, but not *Vil2^{kd/kd}* mice (C).

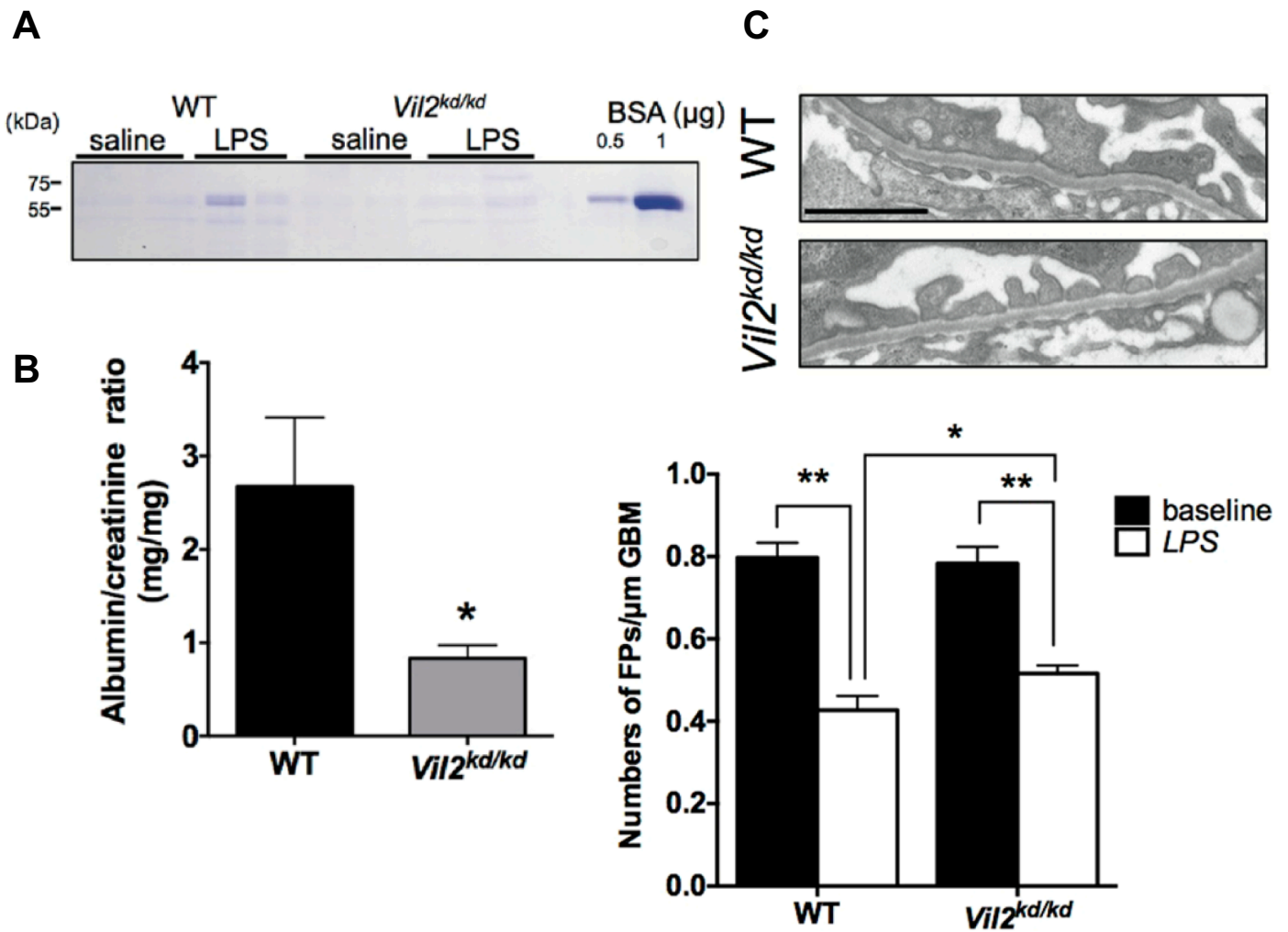


Fig. 16 Morphological Changes in Podocytes and Functional Changes in LPS-induced Glomerulopathy.

LPS (200 μg) was administrated intraperitoneally. After 24 h, spot urine was collected, separated by SDS-PAGE, and stained with CBB (A). As a positive control, BSA (0.5 and 1 μg) was loaded. Urinary albumin and creatinine concentrations were measured and ACR (mg albumin/mg creatinine) was calculated (WT: n = 9, *Vil2^{kd/kd}*: n = 9) (B). Electron microscopic analysis was performed in these mice (magnification × 19,000, Scale bar: 1 μm). Number of foot processes/μm of GBM was measured (C).

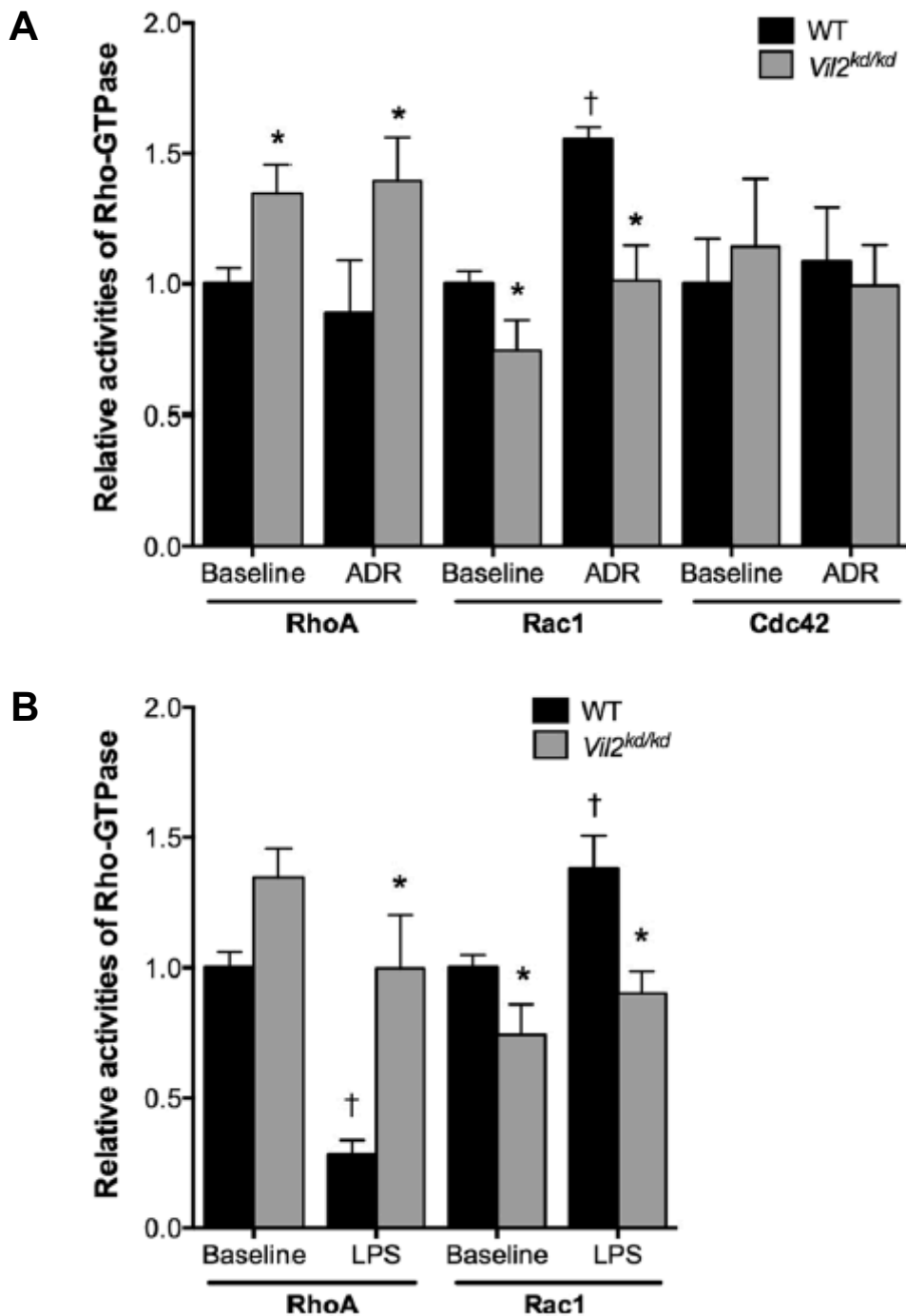


Fig. 17 Rho-GTPase Activity Assay Using Isolated Glomeruli.

Rho-GTPase activity—including RhoA, Rac1 and Cdc42—was measured by an ELISA-based Rho-G-LISA assay. Isolated glomeruli from both untreated and ADR-treated WT and *Vil2^{kd/kd}* mice were used in this study (n = 5–11) (A). Isolated glomeruli from both untreated and LPS-treated WT and *Vil2^{kd/kd}* mice were used in this study (n = 5–8) (B).

* $p < 0.05$, vs. WT at the same condition. † $p < 0.05$, vs. baseline for the same genotype.

Table 3 Localization of ERM Proteins in Mouse Glomeruli.

	podocytes			endothelial cells
	apical membrane	cytosol	slit diaphragm	
Ezrin	+	—	—	—
Radixin	—	—	—	+
Moesin	—	—	—	+

Table 4 The Function and Activity Changes of Rho-GTPase in WT and *Vil2^{kd/kd}* Mice.

	RhoA	Rac1	Cdc42
effect for foot process by activating	protective	loss	no change
effect for foot process by inactivating	loss	protective	loss
ADR-treated WT mice	no change	higher	no change
LPS-treated WT mice	lower	higher	no change
ADR-treated <i>Vil2^{kd/kd}</i> mice compared with WT mice	higher	lower	no change
LPS-treated <i>Vil2^{kd/kd}</i> mice compared with WT mice	higher	lower	no change

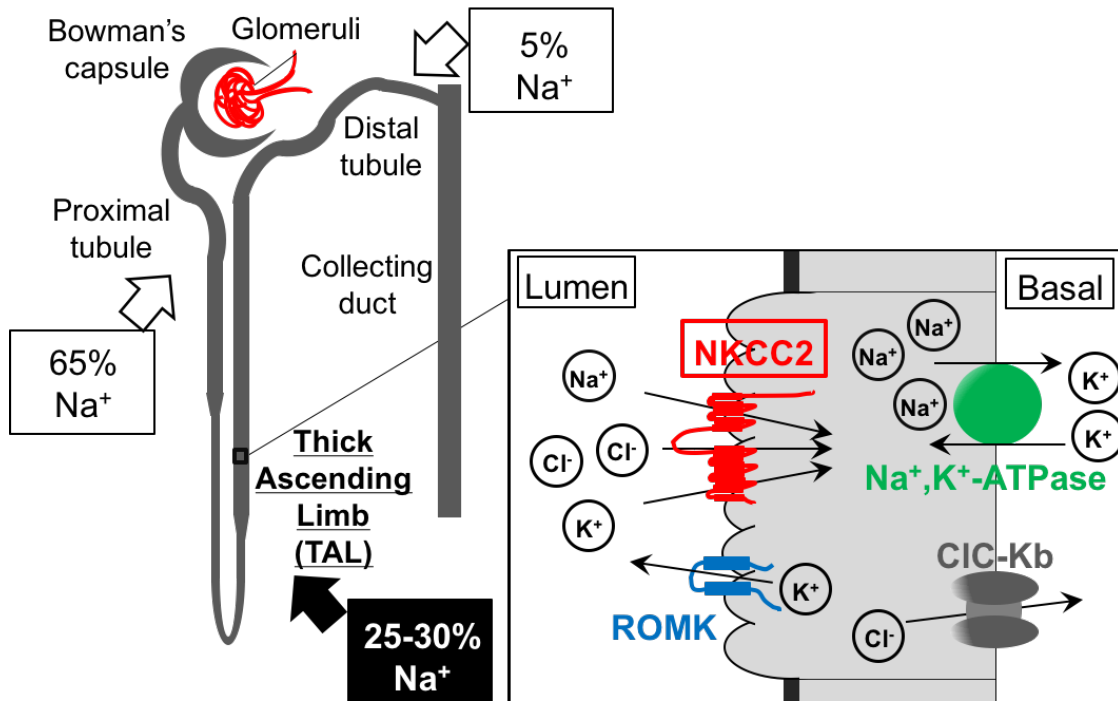


Fig.18 Electrolytes Reabsorption in TAL.

In TAL, 25–30% of Na^+ filtered through the glomeruli are reabsorbed. TAL plays an important role in the maintenance of salt and fluid homeostasis. NKCC2 plays an essential role in this process.

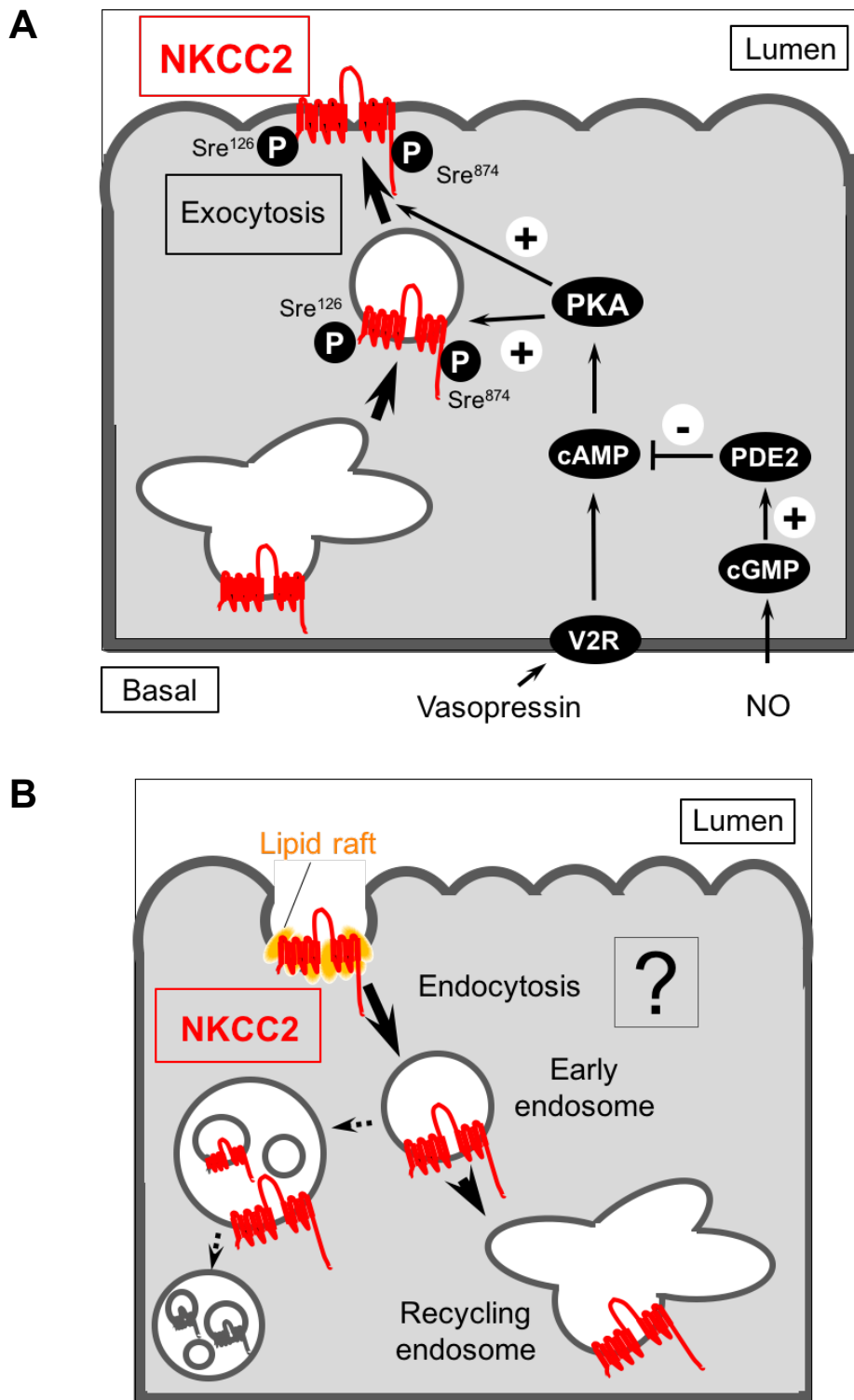


Fig.19 Schematic Figure on Exocytosis and Endocytosis of NKCC2.

The hormonal stimulation of the TAL recruits exocytosis of NKCC2. This process is promoted by phosphorylation of Ser¹²⁶ and Ser⁸⁷⁴ of NKCC2 *via* the cAMP/PKA pathway. Vasopressin binds vasopressin V₂ receptor (V2R) and increases intracellular cAMP (A). Lipid raft localization of NKCC2 is important for the endocytosis of NKCC2 since this process is completely blunted by the disruption of lipid raft by methyl- β -cyclodextrin (B).

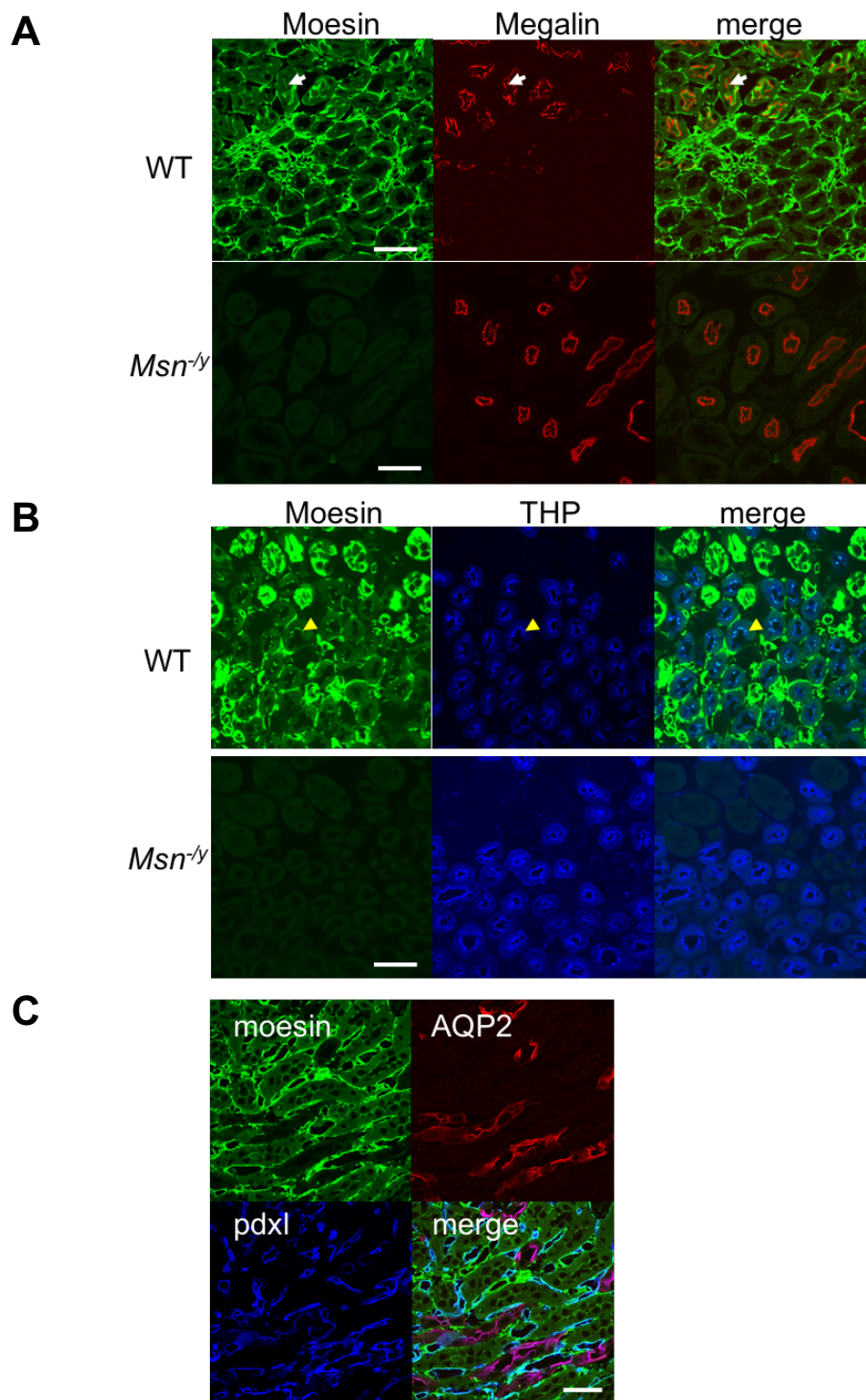


Fig. 20 Immunofluorescent Analysis of WT and *Msn*^{-/-} Mice.

Kidney tissue sections from WT and *Msn*^{-/-} mice were co-immunostained with moesin, and megalin (marker for proximal tubule) (A), or THP (Tamm Horsfall protein: marker for TAL) (B). White arrow indicates apical membrane of proximal tubule, in which positive immunostaining for moesin is observed (A). Yellow arrowhead indicates apical membrane of TAL, in which positive immunostaining for moesin is observed (B). Moesin expression was lacked in the collecting ducts (AQP2, as a marker of collecting duct) (C). Scale bar: 25 μ m (A), (B) and 20 μ m (C).

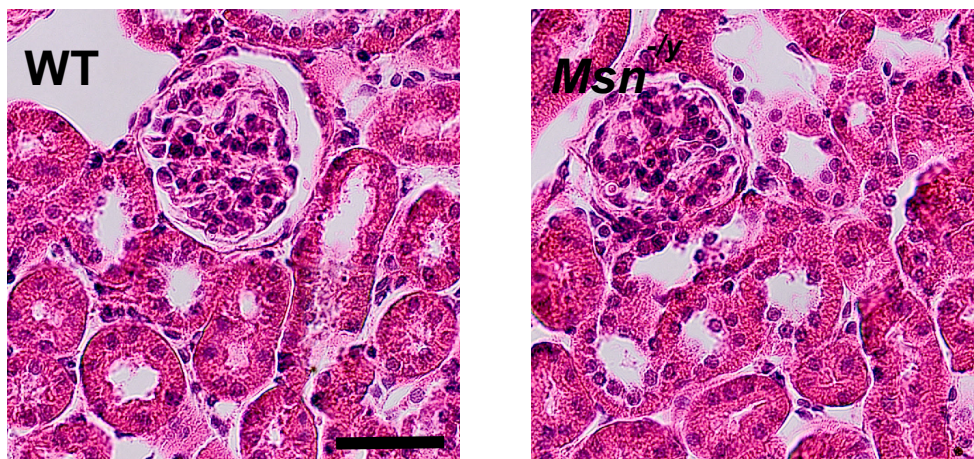


Fig. 21 Histological Analysis of WT and *Msn*^{-y} Mice.

Hematoxylin & Eosin staining was performed using the kidney tissue section from WT and *Msn*^{-y} mice. (Scale bar 25 μ m)

Table 5 Biochemical Parameters of Plasma and Urine and GFR in WT and *Msn*^{-/-} Mice.

	WT n = 12	<i>Msn</i> ^{-/-} n = 13
Plasma		
Na ⁺ , mM	150.6 ± 0.7	151.9 ± 0.5
K ⁺ , mM	6.7 ± 0.5	6.5 ± 0.4
Cl ⁻ , mM	112.4 ± 0.7	115.5 ± 1.0*
Creatinine, mg/dL	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.03
Urine		
Volume, mL/day	1.37 ± 0.15	1.12 ± 0.12
ENa, μmol/100 g BW/day	716.1 ± 163.8	652.7 ± 97.5
EK, μmol/100 g BW/day	682.4 ± 174.1	724.8 ± 171.7
ECl, μmol/100 g BW/day	505.9 ± 91.1	452.1 ± 58.4
FENa, %	0.07 ± 0.02	0.15 ± 0.03*
FEK, %	1.65 ± 0.41	4.79 ± 1.59
FECl, %	0.08 ± 0.02	0.13 ± 0.02*
Blood (n = 5, each)		
Bicarbonate, mM	15.96 ± 0.98	15.33 ± 0.64
pH	7.04 ± 0.02	7.04 ± 0.01
GFR, μL/min (n = 3 each)	199 ± 18	124 ± 15*

**p* < 0.05, vs. WT

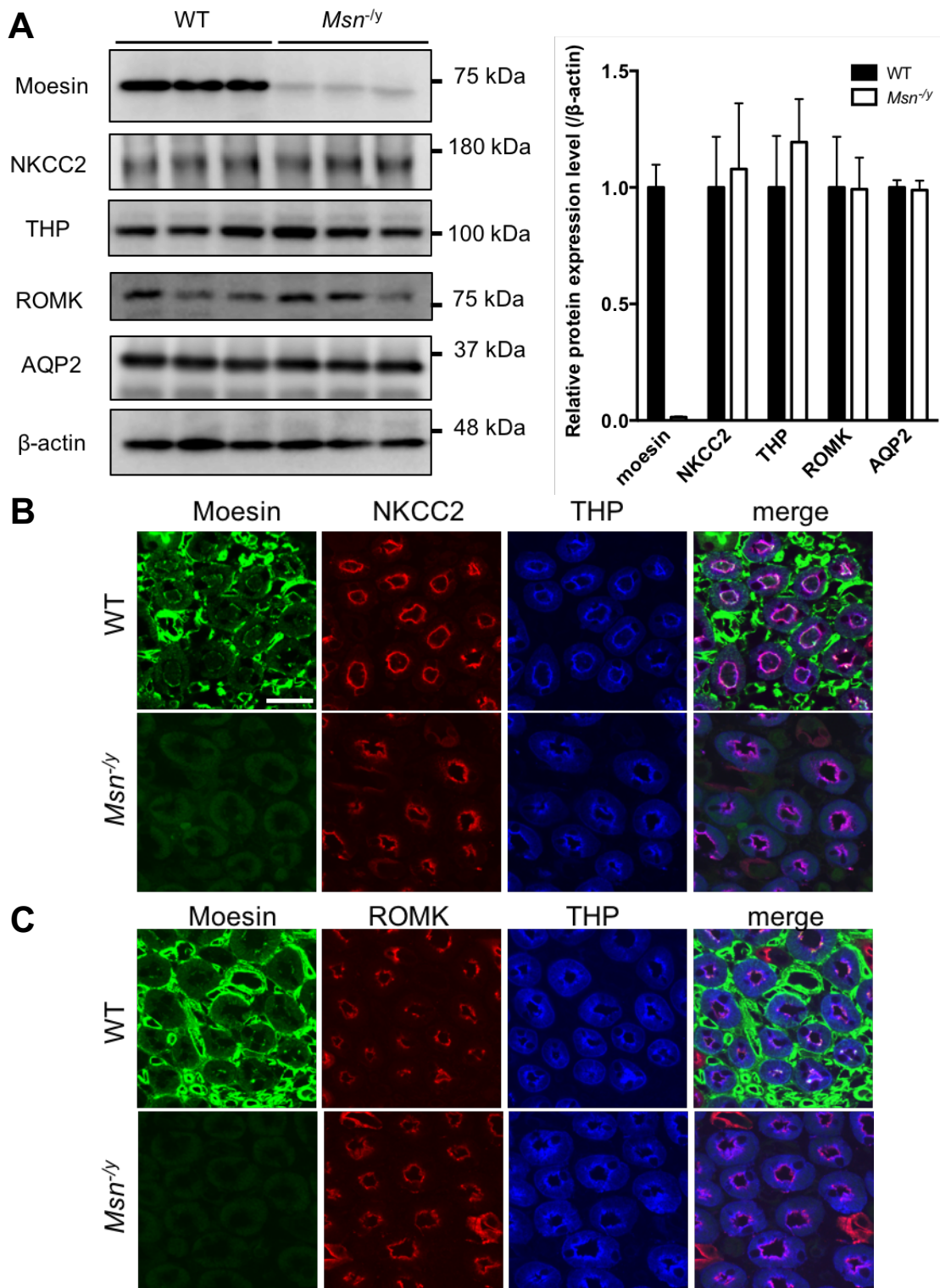


Fig. 22 Expressions and Localizations of Moesin and Other Proteins (NKCC2, THP, and ROMK) in the Kidney.

Immunoblotting for moesin and other proteins expressed in TAL (NKCC2, THP) using mouse renal medulla lysate (A). Densitometric analysis was performed (n = 3, respectively) (A). Subcellular localizations of NKCC2, co-stained with THP (B) and ROMK (C) were examined in WT and *Msn*^{-/-} mice by the immunofluorescent analysis. (Scale bar 20 μm)

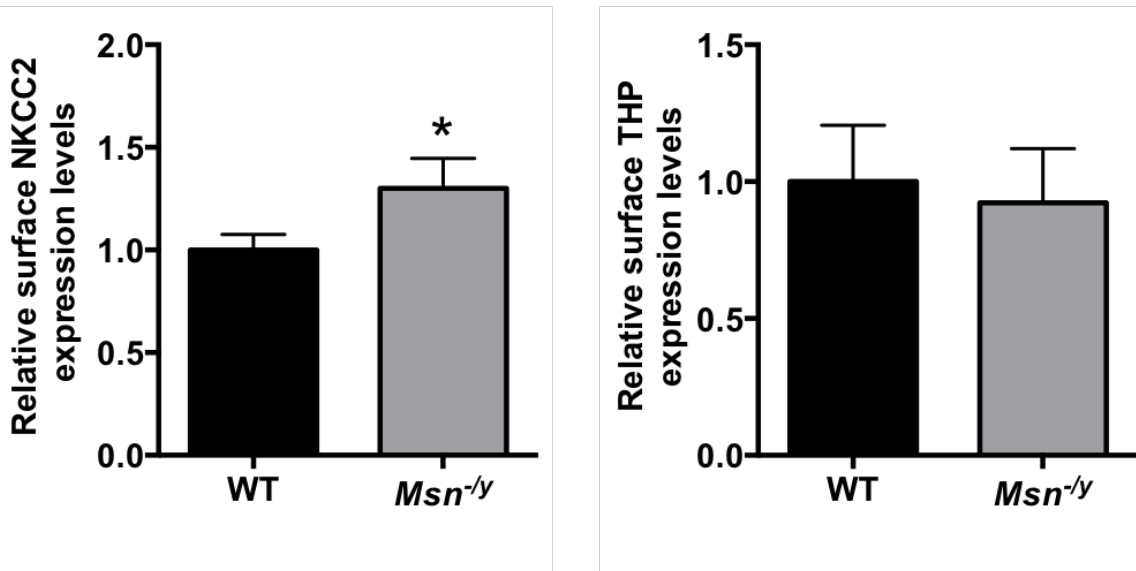
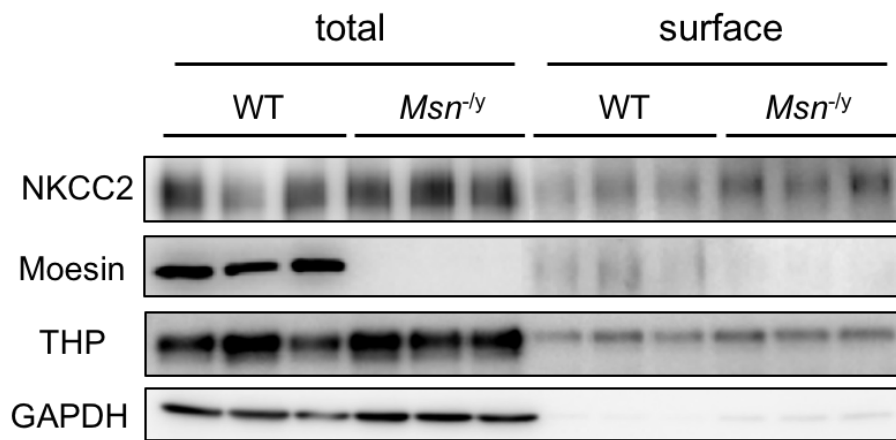


Fig. 23 Surface Biotinylation Assay for the NKCC2.

Surface biotinylation assay was performed using medullary tubular suspensions from WT and *Msn*^{-/-} mice. Surface expression levels of NKCC2, moesin, and THP were compared with total expression levels. Densitometric analysis for surface expressions of NKCC2 and THP was performed as shown in graph (n = 11, respectively). * *p* < 0.05 vs. WT.

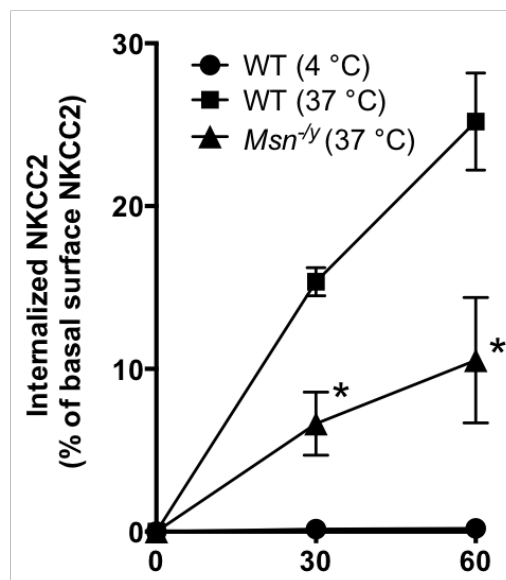
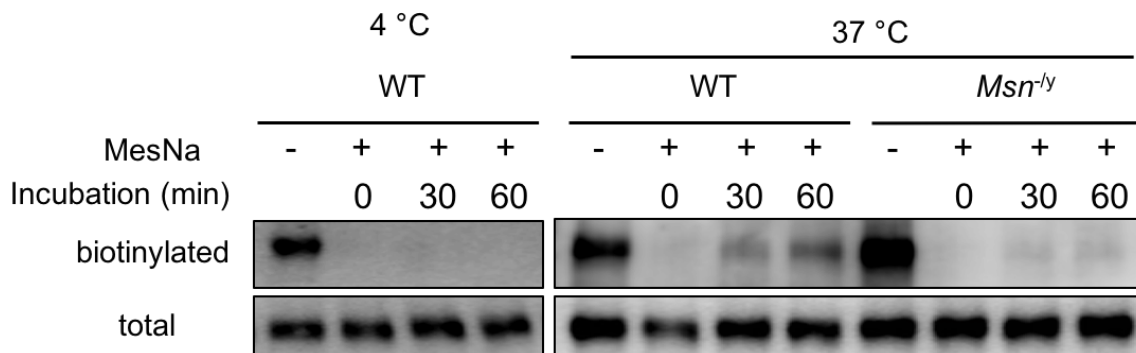
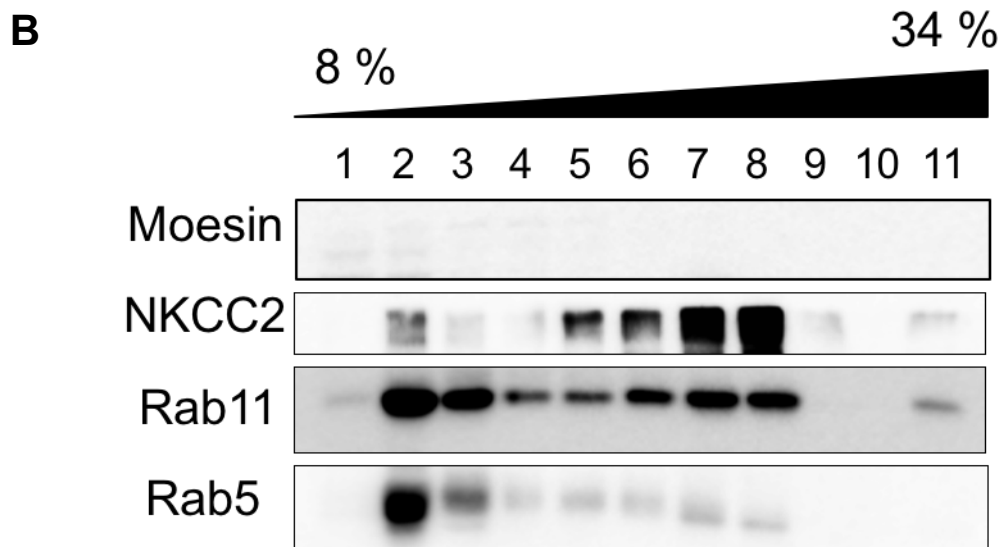
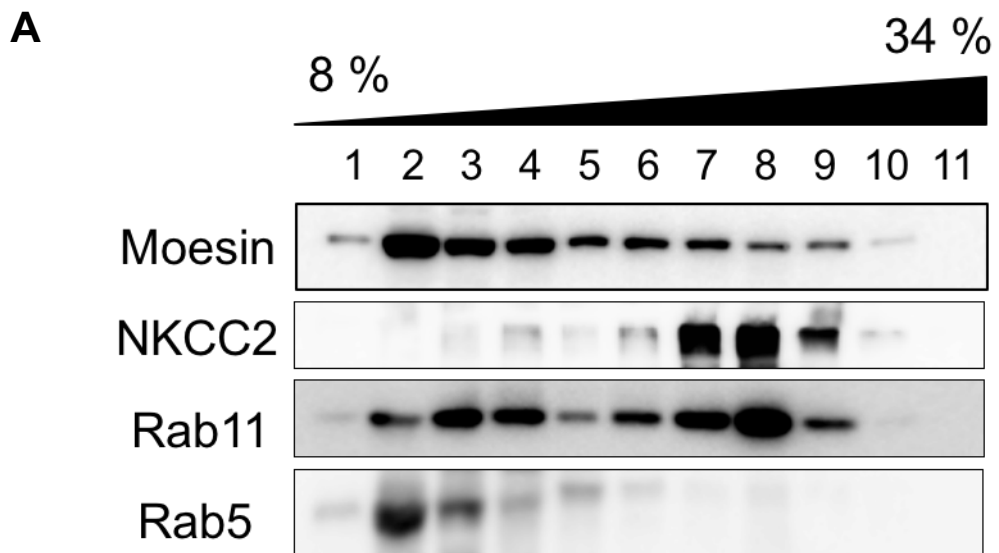


Fig. 24 Internalization Assay for the NKCC2.

Internalization assay was also performed using medullary tubular suspensions. Densitometric analysis for internalized NKCC2 was performed. Data are expressed as a percentage of basal surface expression of NKCC2. (n = 3, respectively). * $p < 0.05$ vs. WT (37 °C)



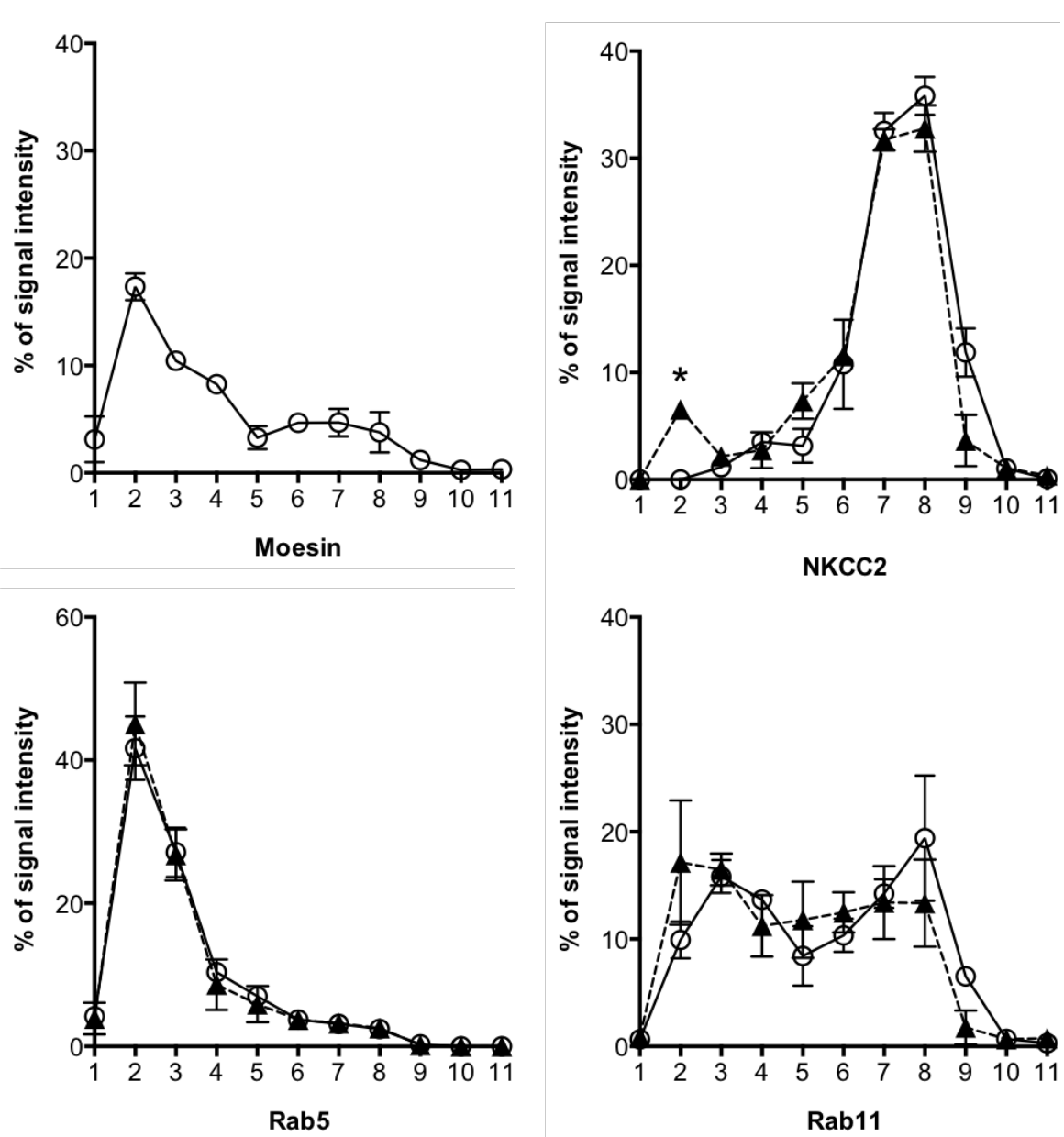
C

Fig. 25 Subcellular Fractionation of Renal Medulla Lysate by Density Gradient Centrifugation.

Subcellular fractionation of renal medulla lysate from WT (A) and *Msn*^{-/-} (B) mice was performed by 8%–34% OptiPrep-based density gradient centrifugation method. The distribution of Rab5 (endosome) or Rab11 (recycling endosome) was examined. Densitometric analysis for moesin, NKCC2, Rab5, and Rab11 was performed. Data are expressed as a percentage of total protein expression (n = 3, respectively) (C). Open circle (○) represents protein expressions in WT kidney. Closed triangle (▲) represents protein expressions in *Msn*^{-/-} kidney. **p* < 0.05 vs. WT

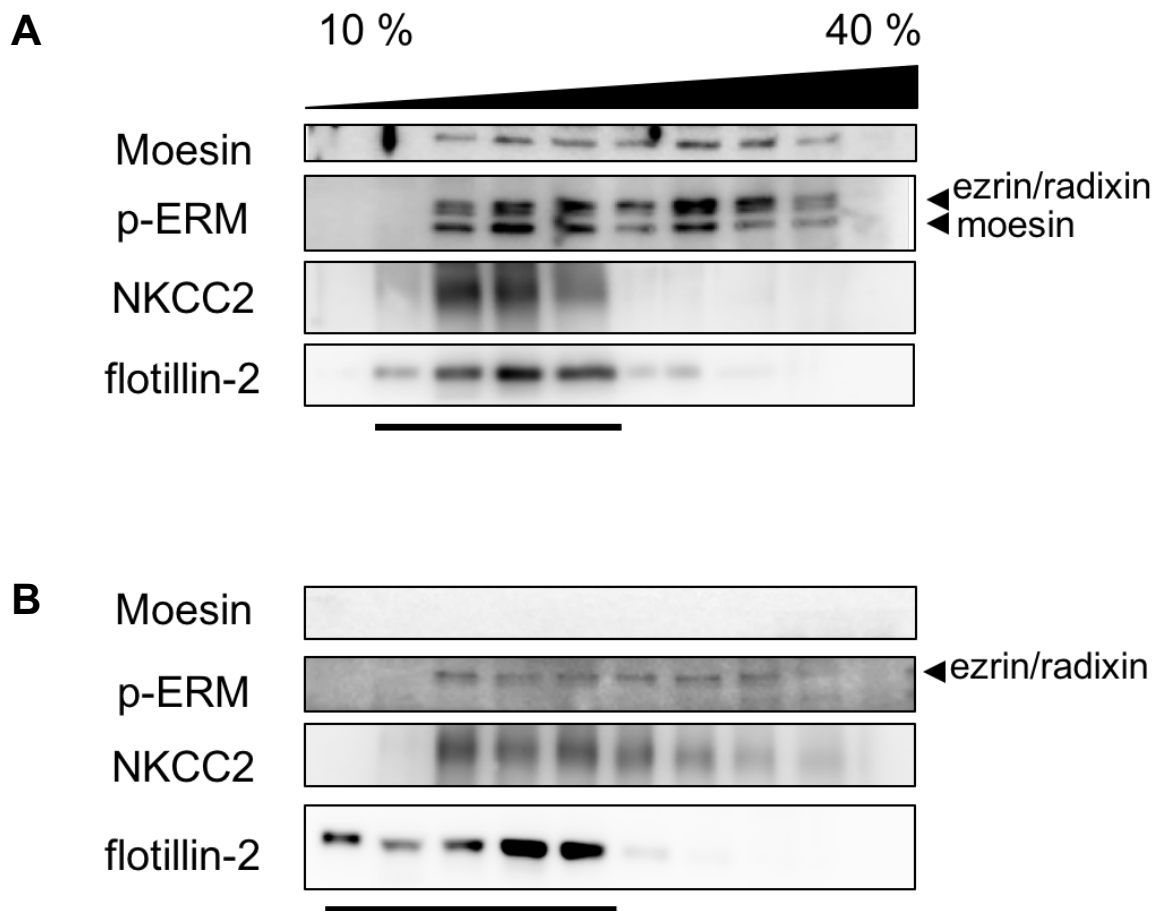


Fig. 26 Fractionation of Lipid Raft by Density Gradient Centrifugation.

Lipid raft fractions were separated by the 10–40% Optiprep-based density gradient centrifugation method in WT (**A**) and *Msn*^{-/-} (**B**) mice. The expression of flotillin-2 as a marker of lipid raft was examined. The fractions containing flotillin-2 were shown by bold lines at the bottom of figures

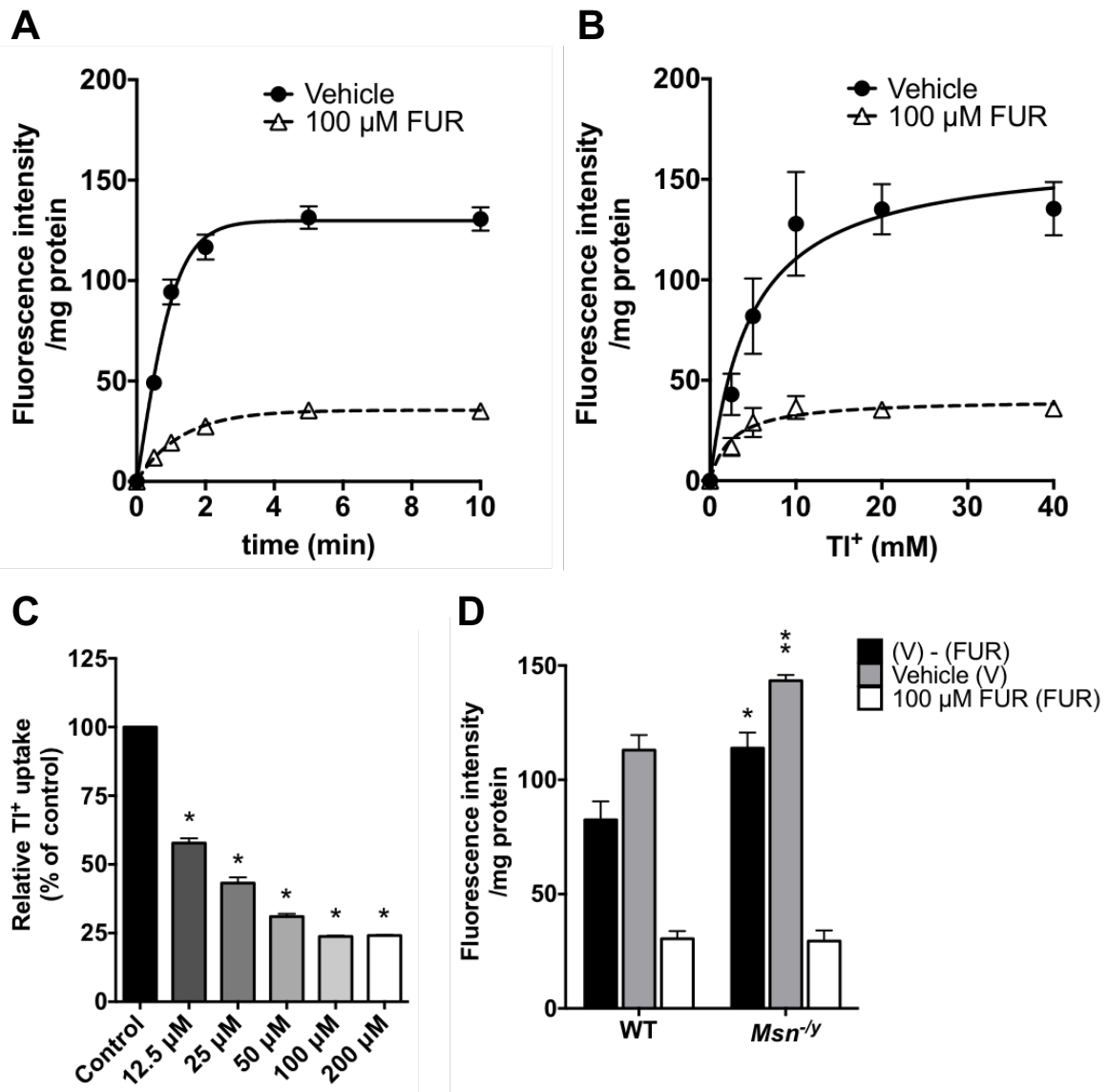


Fig. 27 Analysis for NKCC2 Activity in Medullary Tubular Suspension.

Time-dependent TI^+ uptake (10 mM TI^+ , 37 °C) was examined using medullary tubular suspension from WT mice in the presence or absence of Furosemide (100 μM) (n = 3, respectively) (A). Concentration-dependent TI^+ (2.5, 5, 10, 30, and 40 mM TI^+) uptake (37 °C, 5 min) were examined using medullary tubular suspension from WT mice in the presence or absence of Furosemide (100 μM) (n = 3, respectively) (B). Inhibition of tubular TI^+ uptake (10 mM TI^+ , 37 °C, 5 min) by Furosemide (12.5, 25, 50, 100, and 200 μM Furosemide) (n = 3, respectively) (C). Furosemide sensitive-tubular TI^+ uptake activity (10 mM TI^+ , 37 °C, 5 min) was compared between WT and *Msn*^{-/-} mice (n = 4, respectively) (D). **p* < 0.05 vs WT. ***p* < 0.01 vs. WT. Furosemide sensitive-tubular TI^+ uptake activity was shown as the black bar

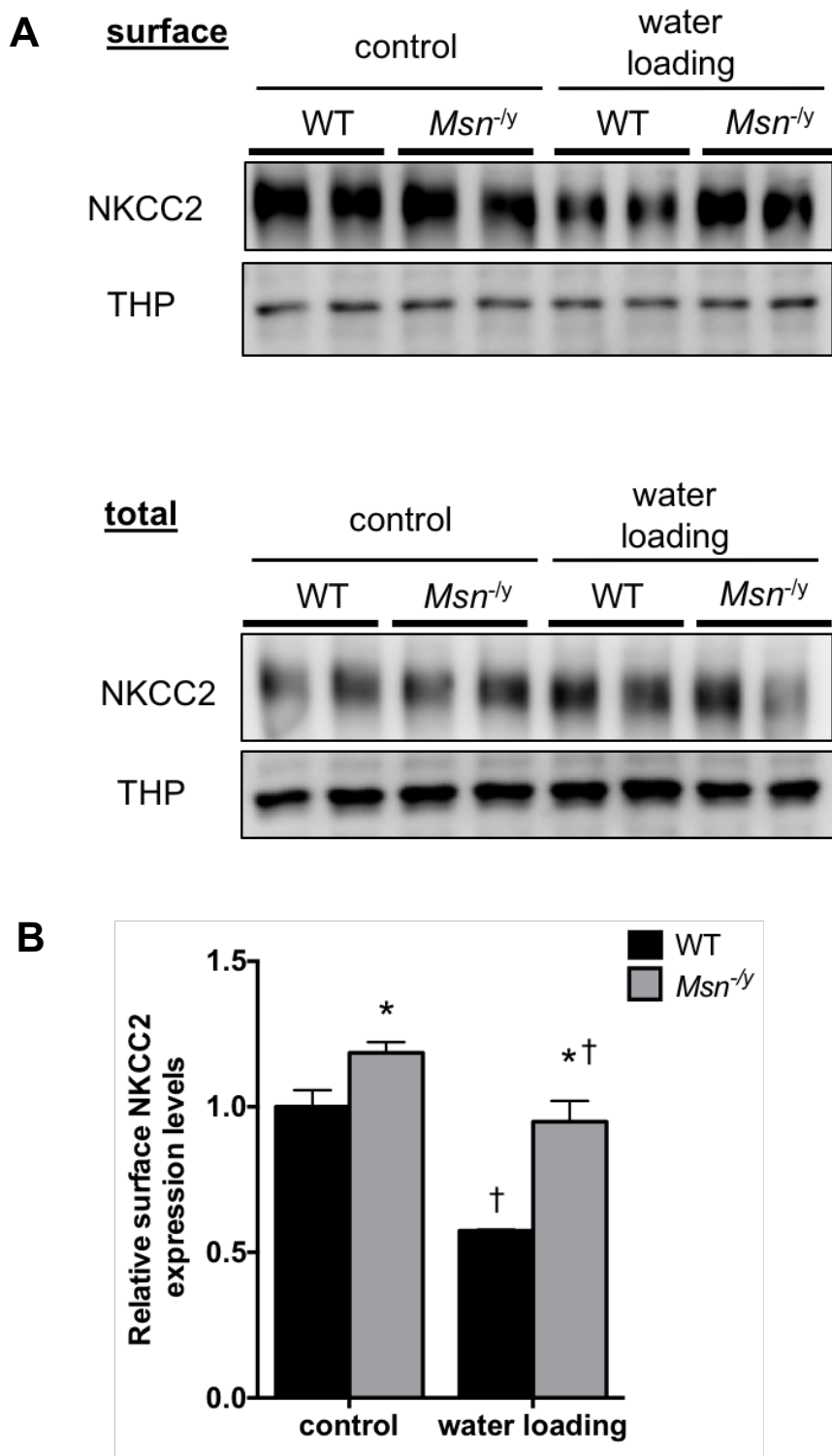


Fig. 28 Analysis for Surface Expression of NKCC2 and THP in Water Loading Condition.

Surface expressions of NKCC2 and THP in the medullary tubules after water loading were examined by surface biotinylation and immunoblotting (A). Densitometric analysis was performed for the surface expression levels of NKCC2 in water loading condition (n = 5, each, * $p < 0.05$ vs. WT mice with same condition, † $p < 0.05$ vs. control mice with same genotype) (B).

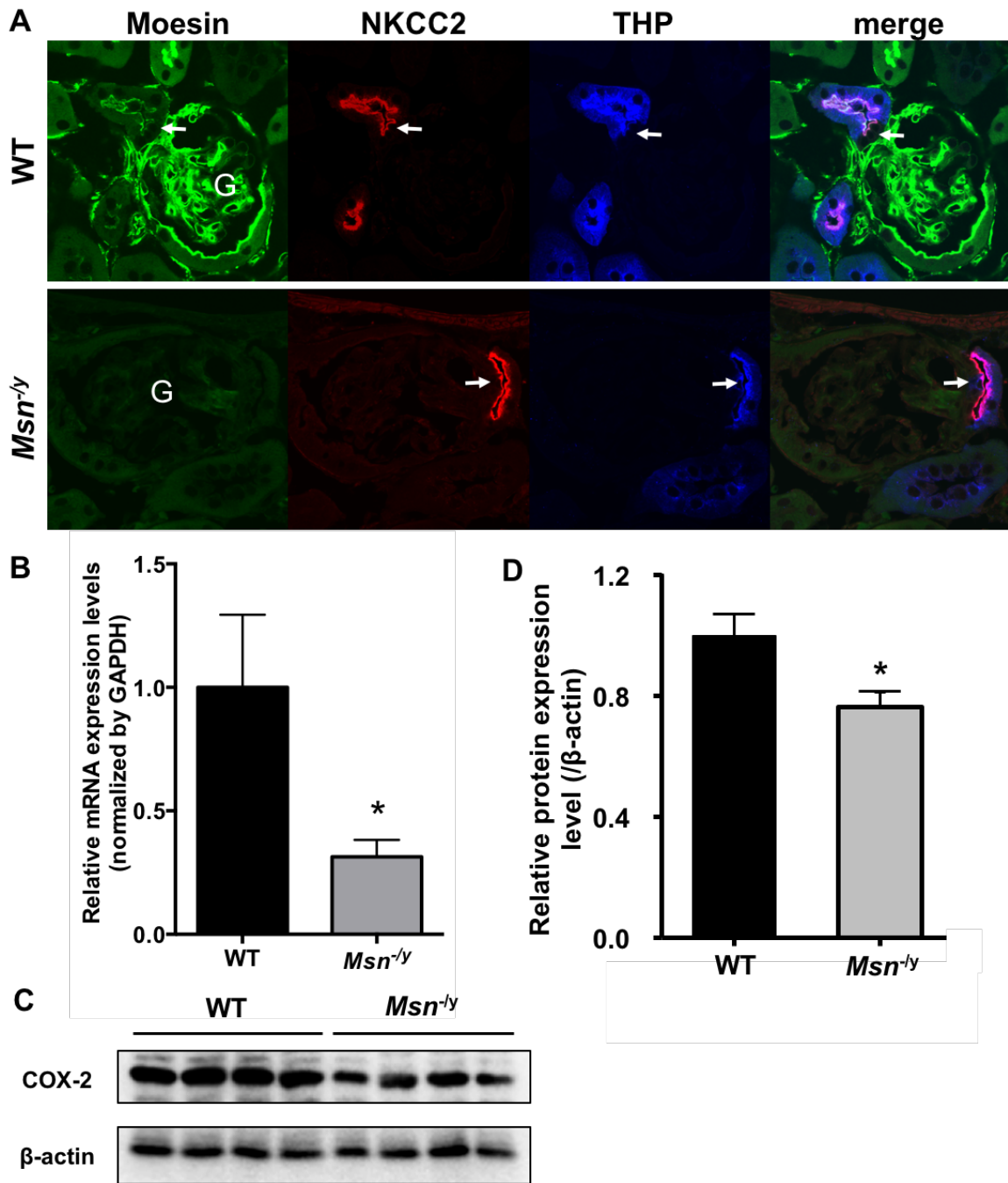


Fig. 29 Analysis for Moesin Expression in the Cortical TAL and Macula Densa Cells, and Real-time PCR and Western Blot Analysis for Renocortical COX-2 Expression.

Immunostaining for moesin, NKCC2, and THP was performed. In the cortical TAL, all of these proteins were expressed. In the macula densa cells (NKCC2⁺/ THP⁻: white arrow) of WT mouse, moesin was expressed at apical membrane and co-localized with NKCC2. G: glomeruli (A). Renocortical mRNA and protein expression of COX-2 was examined by real-time PCR (n = 9, respectively) (B) and Western Blot. (n = 11, respectively) (C, D), **p* < 0.05 vs WT

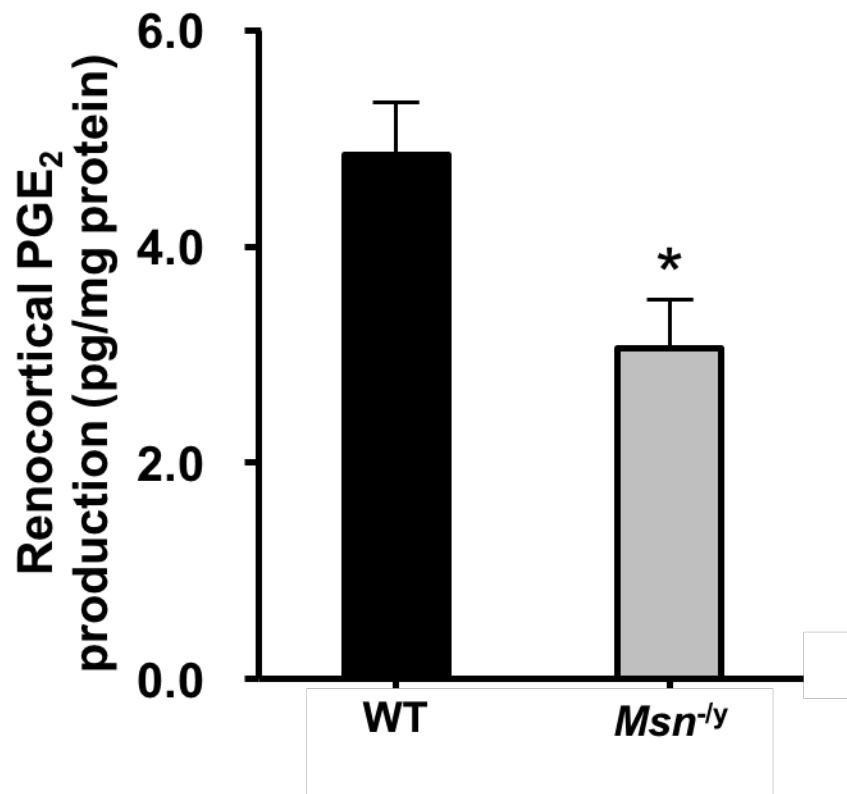


Fig. 30 Assay for Renocortical PGE₂ Level.

Renocortical PGE₂ level was examined by EIA assay (WT; n = 8, *Msn*^{-ly}; n = 5),

* $p < 0.05$ vs WT