

令和 5 年 10 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15329

研究課題名(和文) ユビキチンプロテアソーム系が腎臓の恒常性維持と障害・修復にはたす役割の統合的解明

研究課題名(英文) The role of Ubiquitin-Proteasome system in the kidney injury and regeneration

研究代表者

柳田 素子 (Yanagita, Motoko)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70378769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腎臓の恒常性維持におけるユビキチン・プロテアソーム系(以後UPS系)の役割を解明することを目的とした。我々が以前に作成した近位尿細管特異的な誘導型Creマウスとプロテアソームのコンポーネントのfloxマウスを交配して作成したマウスにタモキシフェンを投与し、近位尿細管特異的にプロテアソームのコンポーネントが欠損したコンディショナルノックアウトマウスを生成したところ、同ノックアウトマウスは腎不全から死に至ることを見出した。ノックアウトマウスでは、尿細管障害の所見に加え、オートファジーフラックスの障害を示唆する所見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓においては古くから腎臓の恒常性維持に重要な役割を果たすタンパクがUPSで分解されることが知られていたが、UPSが総体として腎臓の恒常性維持、生理機能をどのように制御しているかは明らかではなかった。高等生物では数百種類に及ぶユビキチンリガーゼがあることもその総合的な機能解析を困難にしていた。本系は、UPS系が近位尿細管の恒常性維持に果たす役割を示す点で重要である。UPS系阻害薬は臨床でも使用されており、その観点からも本解析は意義がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the role of the ubiquitin-proteasome system (hereafter referred to as the UPS system) in the maintenance of kidney homeostasis. We generated conditional knockout mice lacking a certain proteasome component in a proximal tubule-specific manner by injecting tamoxifen into offsprings between our previously generated proximal tubule-specific inducible Cre mice and floxed mice of the proteasome component. We found that the abovementioned conditional knockout mice died from renal failure. The knockout mice showed the signs of tubular damages and impaired autophagic flux.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ユビキチンプロテアソーム系 腎臓病

1. 研究開始当初の背景

多種多様なタンパク質の発現制御にはタンパク質分解系が重要な役割を果たしている。タンパク質分解系には、非選択的分解系であるオートファジーと、選択的タンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソーム系(以後 UPS 系)があり、酵母から高等動物まで保存されている。UPS 系は、分解を運命づけられたタンパク質や変成タンパク質にユビキチンリガーゼがユビキチンを付加し、その標的タンパク質をプロテアソームによって分解する。数百種類のユビキチンリガーゼの基質認識機構は厳密であり、処理はきわめて迅速である。

UPS 系は、細胞増殖や分化などさまざまな経路にかかわるタンパク質を選択的に分解することで、その機能を質的・量的に変化させ、細胞機能を制御する。その制御は細胞周期、シグナル伝達、DNA 修復、免疫応答、細胞骨格など、細胞の恒常性維持にきわめて重要な複数のシステムに及んでおり、その重要性から 2004 年にノーベル賞が授与されている。さらに近年、プロテアソーム機能の破綻が癌やパーキンソン病、免疫異常など様々な難治性疾患を起こすことや、プロテアソーム阻害薬が骨髄腫に有効であることが明らかになり、臨床面からも注目されている。

腎臓においては古くからエリスロポエチン制御や低酸素応答に必須の転写因子である Hypoxia Inducible Factor (HIF) や Na 再吸収に重要な役割を果たす Epithelial Na Channel (ENaC) など、腎臓の恒常性維持に重要な役割を果たすタンパク質が UPS で分解されることが知られていたが、これらの知見は各論にとどまっており、UPS が総体として腎臓の恒常性維持、生理機能をどのように制御しているかは明らかではなかった。特に近位尿細管は電解質・水代謝、糖代謝がダイナミックに制御されており、腎において最も重要な segment であるにも関わらず、その全貌は明らかではない。高等生物では数百種類に及ぶユビキチンリガーゼがあることもその総合的な機能解析を困難にしていた。

2. 研究の目的

(1) 腎臓の恒常性維持、生理機能における UPS の役割の解明

従来の UPS の研究は、特定のタンパク質のユビキチン化を媒介するユビキチン

リガーゼに焦点を当てることで、そのタンパク質分解の制御機構を明らかにしてきた。しかしながら、高等生物ではユビキチンリガーゼは数百種類におよび、機能的にも重複があることから、その制御機構を明らかにするのは容易ではない。しかもこのアプローチは、特定のタンパク質が UPS で処理されることを明らかにするのにとどまっており、UPS で処理されるタンパク質を総体としてとらえ、その共通項や機能的連関を明らかにすることは困難であったが、我々は、プロテアソームのコンポーネントの flox マウスと、自ら開発した腎臓構成細胞な誘導型 Cre マウスを用いて、任意の時点で任意の構成細胞で UPS を阻害することを可能にした。本項目では、腎臓の恒常性維持、生理機能における UPS の役割を解明することを目的とした。

(2) 腎臓における UPS とオートファジー系とのクロストーク

オートファジーは、プロテアソーム系と並ぶ主要な細胞内分解システムである。オートファジーと UPS はお互いに相補的な関係にあると考えられており、オートファゴソームに局在するユビキチン結合タンパク質 p62 は、両方の分解経路のクロストークの中心的な役割を果たすものと考えられている。また、オートファジーは急性腎障害、糖尿病性腎症に伴う尿細管障害に対して保護的に働くことが報告されている。本研究では、腎臓の近位尿細管における UPS の阻害に伴い、オートファジーがどのように修飾され、それが腎臓の恒常性維持にどのような役割を果たすのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 近位尿細管の恒常性維持における UPS の機能解析

本項目では任意の時点で近位尿細管における UPS を阻害することによって、腎臓の恒常性維持における UPS の機能を解析する。胎生期からの UPS の阻害は細胞特異的であっても胎生致死や形態異常を来す可能性があることから、我々が過去に作成した近位尿細管特異的な誘導型 Cre マウスとプロテアソームのコンポーネントの flox マウスを交配して作成したマウスにタモキシフェンを投与して近位尿細管特異的に UPS 系を阻害した。近位尿細管の恒常性維持における UPS の役割を解明するために、アポトーシス、細胞周期関連分子の解析および蓄積したユビキチン化蛋白の同定を行った。

(2) 近位尿細管における UPS とオートファジー系とのクロストークの解析

preliminary な研究で観察された表現型からはオートファジーによる代償機構が破綻している可能性が想定された。オートファジーとの相互作用の有無を解析するために、オートファジー可視化マウスと交配し、オートファジー構成要素を免疫染色で評価した。

(3) 近位尿細管における UPS によるミトコンドリアダイナミクス

本項目では、同マウスの尿細管が変成・脱落する原因を明らかにするために定性的な評価経時的なミトコンドリアの形態観察に加えて機能的な評価を行った。

4. 研究成果

(1) 近位尿細管の恒常性維持における UPS の機能解析

我々が過去に作成した近位尿細管特異的な誘導型 Cre マウス (Ndr1CreERT2 mice) とプロテアソームのコンポーネントの flox マウスを交配して作成したマウスにタモキシフェンを投与し、プロテアソームのコンポーネントが近位尿細管特異的に欠損したコンディショナルノックアウトマウス(以降ホモマウス)を生成した。コントロールマウスと比較してホモマウスでは、UPS 阻害の傍証となるユビキチンの蓄積を認めた。

次にタモキシフェン投与による組み替え後の自然経過を観察したところ、コントロールマウスは全マウスが生存したのに対し、ホモマウスではタモキシフェン投与後数日で全マウスが個体死に至った。生存状況の解析では、コントロールと比較してホモマウスではBUNやCrといった腎機能検査が著明に上昇しており、PAS染色において皮質浅層から深層まで近位尿細管の空胞変性、膨化を認め、腎障害マーカーである kim1 は免疫染色においてホモマウスで著明に発現が上昇していた。加えて、ホモマウスにおいてアポトーシスの亢進、細胞周期の停止に陥ることが示唆された。

(2) 近位尿細管における UPS とオートファジー系とのクロストークの解析

飢餓などによりオートファジーが誘導されると、細胞質に出現した隔離膜が伸張し、細胞質のタンパク質やミトコンドリアを含みながら閉鎖することでオートファゴソームが形成される。オートファゴソームの外膜とリソソームが融合したものはオートリソソームと呼ばれ、融合により取り囲まれた細胞内のタンパク質が分解される。LC3 は隔離膜上に存在するため、オートファゴソームのマーカーとしては広く利用されている。p62 は LC3 結合ドメインを有するため、ユビキチン化された不要タンパク質の凝集体やミト

コンドリアなどと結合し、オートファゴソームによる分解を促すユビキチン受容体として機能する。本研究では、免疫染色においてホモマウスでは、オートファジーフラックスの障害を示唆する所見が得られた。

(3) 近位尿細管における UPS によるミトコンドリアダイナミクス

プロテアソームを阻害するとミトコンドリア障害が起こり、アポトーシスを誘導することが報告されている。本研究における組み換え後の検討では、早期からミトコンドリアの膨化、断片化などの形態変化を示した。そこでミトコンドリアダイナミクスを評価するために近位尿細管株にプロテアソーム阻害剤である MG132 を投与し評価を行った。近位尿細管培養細胞に MG132 投与した群においてミトコンドリア膜電位の低下、酸化リン酸化の低下に加えて解糖系が代償性に上昇しており、機能的にミトコンドリア予備能が低下していることが示唆された。本研究により、UPS は近位尿細管の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられた。UPS 機能を賦活化させることが近位尿細管障害に対する治療薬としての役割を果たす可能性があるかどうかに関しては今後のさらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3件)

比良野圭太, 田代善崇, 柳田素子.
近位尿細管の恒常性維持におけるユビキチン・プロテアソーム系の機能解析.
日本腎臓学会学術総会, 2019年6月21日~23日, 名古屋国際会議場(愛知県).

比良野圭太, 田代善崇, 柳田素子.
ユビキチン・プロテアソーム系による近位尿細管ミトコンドリアダイナミクス制御機構.
日本腎臓学会学術総会, 2020年8月19日~21日, パシフィコ横浜(神奈川県).
Hirano Keita, Tashiro Yoshitaka, Yanagita Motoko.

Ubiquitin-Proteasome System Actively Maintains Homeostasis of Proximal Tubules. American Society of Nephrology, 2019年11月7日~9日, ワシントン.

[その他]
ホームページ等

<http://www.kidney.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柳田 素子 (YANAGIYA, Motoko)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：7 0 3 7 8 7 6 9

(2)連携研究者

金井 好克 (KANAI, Yoshikatsu)
大阪大学・医学研究科・教授
研究者番号：6 0 2 0 4 5 3 3