

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790559

研究課題名(和文) メガリンの細胞内輸送を調節する分子学的機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of megalin-mediated endocytosis

研究代表者

飯野則昭(IINO NORIAKI)

新潟大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：10420308

研究成果の概要：メガリンの細胞質領域と蛋白複合体を形成する新規蛋白 non-muscle myosin heavy chain IIA(NMHCII-A)を培養細胞(IRPTC)から immunoprecipitation 法と質量分析の手法で同定した。NMHCII-A は Dab2 を介してメガリンの細胞質領域と結合することが明らかになった。NMHCII-A の機能阻害する blebbistatin を培養細胞に添加すると、メガリンのリガンドである lactoferrin の細胞内への取り込みが抑制されることが明らかになった。さらに、blebbistatin 投与下でのメガリン受容体の動きを可視化すると、メガリンはリガンド結合後も細胞表面に留まっているように見えた。このことから NMHCII-A はメガリンのエンドサイトーシスにおいて、機能的に重要な働きを有していることが明らかになった。Sucrose gradient と超遠心を組み合わせて細胞内の各コンポーネントを分画したところ、メガリン、Dab2、NMHCII-A は同一の endosomal fraction に存在することも明らかになった。以上より In vivo においてもこれらの三者は協調しながらメガリンのエンドサイトーシスを調節している可能性が示唆された。今後、さらに知見が蓄積されることで、複雑なエンドサイトーシスの分子学的機序が明らかにされることが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	210,000	3,010,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：megalin, Dab2, ARH, endocytosis, immunoprecipitation

## 1. 研究開始当初の背景

メガリンは腎臓では近位尿細管の上皮側に選択的に発現し、アルブミンやビタミンDなどの低分子蛋白、薬剤などの再吸収に中心的な役割

を果たす LDL receptor super family に属する再吸収受容体である。メガリンが発見された当初は、メガリンのリガンド検索が精力的に行われ、その数は現在も増え続けている。一方、メガリンの細胞

内輸送機構に関しては不明な点が多い。メガリンの細胞外領域にリガンドが結合すると、その複合体は速やかに clathrin coated pit に集積し、その後 clathrin coated vesicle (CCV)が形成され細胞内に取り込まれる。この CCV は recycling endosome に運ばれ、リガンドは多くの場合ライソゾームへと運ばれ分解を受ける。リガンドがはずれたメガリンは再び細胞膜へと移動し再利用される。Morris や Nagai らにより、この課程を修飾するアダプター蛋白 (Dab2, ARH) の存在が明らかになり、細胞内輸送機構の一端が明らかにされた。われわれは、メガリンやそのアダプター蛋白と蛋白複合体を形成する蛋白群を、免疫沈降や Pull down の手法を用いて抽出し、それぞれの相互作用を解析することで複雑なメガリンのエンドサイトーシス機序を解明したい。

## 2. 研究の目的

本研究ではメガリンの細胞内輸送機構を分子レベルで解き明かすことを最終目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) メガリンと蛋白複合体を形成する新規蛋白の同定

メガリンは Dab2, ARH などのアダプター蛋白と協調して複雑なエンドサイトーシスが調節されている。しかし、その詳細な分子学的課程については明らかにされていない。メガリンを発現する近位尿管由来の培養細胞 (IRPTC) と、抗メガリン抗体を用いて免疫沈降法を行い、メガリンと蛋白複合体を形成する分子群を分離した。得られた蛋白を質量分析法で解析した結果、NMHCII-A と  $\beta$ -actin が同定された。NMHC-IIA は actin 上を分子が移動する際に必要となるモーター蛋白の構成要素であり、メガリンのエンドサイトーシスを動力源として調節する可能性のある分子と考えられた。

### (2) NMHC-IIA とメガリンはどのように結合しているのか?

NMHC-IIA がどのようにメガリンと関係するかを明らかにする目的に、in vitro pull down assay を行った。Dab2 については人由来の全長 Dab2 cDNA、N 末側の部分 Dab2 cDNA、C 末側の部分 Dab2 cDNA からそれぞれ GST-Dab2 融合蛋白を合成した。また、メガリンの細胞内領域をコードする cDNA を用いて GST-メガリン融合蛋白も合成した。NMHC-IIA は TNT T7 rabbit reticulocyte Quick coupled transcription/translation

system(Promega)を用いて S35 標識された蛋白として合成した。これらのプローブを用いて pull down assay を行った。

(3) Megalin mini-receptor, Dab2, NMHC-IIA をそれぞれ発現する蛋白発現ベクターを作成して、これらを Cos7 に遺伝子導入した。メガリン、Dab2、NMHC-IIA の三者を遺伝子導入した細胞、メガリン、Dab2 またはメガリン、NMHC-IIA、Dab2 と NMHC-IIA の 2 者のみを遺伝子導入した細胞も併せて作成した。これらの細胞から immunoprecipitation 法を行い、3 者の関係について検討した。

### (4) Subcellular fractionation assay

ラット腎マイクロゾームを可溶化し、超遠心をした後に、上清を 5-25% sucrose gradient を用いて分画し、メガリン、Dab2、NMHC-IIA が同一コンパートメントに存在するかについてウエスタンブロッティングを用いて検討した。

### (5) Ligand uptake assay

メガリンのリガンドである lactoferrin の取り込みは NMHC-IIA の機能阻害薬 blebbistatin にてどのように変化するか? ラット yolk sac 由来の L2 細胞を用いて、NMHC-IIA の機能阻害薬である blebbistatin の存在、非存在下での lactoferrin の L2 細胞内への取り込みを観察する。

## 4. 研究成果

### (1) メガリンと蛋白複合体を形成する新規蛋白の同定

ラット近位尿管由来の培養細胞 IRPTC と抗メガリン抗体を用いて、immunoprecipitation 法を行った。その結果、210 kDa、40 kDa 付近にコントロールには存在しない蛋白が得られた。これらのバンドを切り抜いて、トリプシン処理などを行い、最終的に質量分析器にかけて、それぞれが NMHC-IIA、 $\beta$ -actin であることが同定された。メガリンは小分子タンパク質の再吸収などに働く中心的な再吸収受容体であるが、今まで、その分子学的機序は不明であった。今回、NMHC-IIA がメガリンと蛋白複合体を形成して、エンドサイトーシス時などに協調して働く可能性が示されたことは、大変意義深い。

### (2) NMHC-IIA とメガリンはどのように結合しているのか?

In vitro pull down assay  
GST-Dab2 (full length)、GST-NDab2 (N-terminal fragment of Dab2)、GST-CDab2 (C-terminal fragment of Dab2)、GST-megalin tail, invitro translated S35 labeled NMHC-IIA をそれぞれ用いて invitro pull down assay を行った。NMHC-IIA は GST-Dab2、GST-CDab2 には結合するが、GST-NDab2、GST-megalin tail とは結合しな

かった。また GST-megalin tail と NMHC-11A との直接の結合も認めなかった。このことから NMHC11-A は Dab2 の C 末領域と結合し、Dab2 の存在下でメガリンとも蛋白複合体を形成していることが明らかになった。

(3) in vitro pull down assay の結果が、遺伝子を導入した培養細胞でも再現されるかについて確認した。NMHC-11A、メガリンミニレセプター、Dab2 をそれぞれコードしたプラスミドを培養細胞 Cos7 に遺伝子導入し、immunoprecipitation 法にてそれぞれの関係を確認した。NMHC-11A とメガリンが Dab2 の存在下でのみ共沈された。培養細胞の系においても、in vitro pull down assay と同様の現象が再現された。

#### (4) Subcellular fractionation assay

ラット腎よりコルテックスを細切り、ラット腎マイクロゾームを得た。これを可溶化し、5-25% の sucrose gradient にて分離して、NMHC-11A、メガリン、Dab2 が生理的条件下で in vivo でどのような局在をしているかを検討した。その結果、これらの3者は定常状態において、同一の endosomal fraction に存在し、何らかの働きをする際にも協調して作用しあっていることが推察された。

#### (5) Ligand uptake assay

メガリンのリガンドである lactoferrin の取り込みを、NMHC-11A の機能阻害物質である blebbistatin の存在下でどのような影響を受けるかについて検討した。Blebbistatin 存在下では、定常状態に比べて lactoferrin の取り込みは有意に低下していた。このことから、NMHC-11A はメガリンのエンドサイトーシスに対して重要な役割を担っていることが考えられた。さらに、リガンドが結合したメガリンを可視化する方法で観察すると、blebbistatin 存在下では、リガンドが結合したメガリンは細胞表面に留まり、エンドサイトーシスが始まらないように見えた。NMHC-11A のメガリンのエンドサイトーシスに与える影響の詳細は不明であるが、エンドサイトーシスのごく早い時期に作用して、全体としてメガリンのエンドサイトーシスを抑制すると推察された。

#### 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)

[雑誌論文](計12件)

Hosaka K, Takeda T, lino N, Hosojima M, Sato H, Kaseda R, Yamamoto K, Kobayashi A, Gejyo F, Saito A. Megalin and nonmuscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled-2 in proximal tubule cells. *Kidney Int.* (in press) 2009. 査読有り

Hosojima M, Sato H, Yamamoto K, Kaseda R, Soma T, Kobayashi A, Suzuki A, Kabasawa H, Takeyama A, Ikuyama K, lino N, Nishiyama A, Thekkumkara TJ, Takeda T, Suzuki Y, Gejyo F, Saito A. Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross talk. *Endocrinology.* 150(2):871-878. 2009. 査読有り

飯野則昭、風間順一郎、下条文武. 次世代血液浄化療法の現状と展望. 腎と透析、p647-650, 2009. 査読なし

Lehtonen S, Shah M, Nielsen R, lino N, Ryan JJ, Zhou H, Farquhar MG. The endocytic adaptor protein ARH associates with motor and centrosomal proteins and is involved in centrosome assembly and cytokinesis. *Mol Biol Cell.* 19(7):2949-2961, 2008. 査読有り

飯野則昭、斎藤亮彦、下条文武. 心血管イベントとしての CKD の病態と治療の方向性. 血栓と循環、p338-343, 2008. 査読なし

後藤眞、山本卓、飯野則昭、杉山晴子、下条文武、丸山弘樹. 腹膜透析症例における動脈硬化指数の検討. 腎と透析、p380-382, 2008. 査読なし

Tanuma A, Sato H, Takeda T, Hosojima M, Obayashi H, Hama H, lino N, Hosaka K, Kaseda R, Imai N, Ueno M, Yamazaki M, Sakimura K, Gejyo F, Saito A. Functional characterization of a novel missense CLCN5 mutation causing alterations in proximal tubular endocytic machinery in Dent's disease. *Nephron Physiol.* 107(4):p87-97. 2007. 査読有り

Saito A, lino N, Takeda T, Gejyo F. Role of megalin, a proximal tubular endocytic receptor, in calcium and phosphate homeostasis. *Ther Apher Dial.* 11 Suppl 1:S23-26. 2007. 査読なし

Kaseda R, lino N, Hosojima M, Takeda T, Hosaka K, Kobayashi A, Yamamoto K, Suzuki A, Kasai A, Suzuki Y, Gejyo F, Saito A. Megalin-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 357(4):1130-1134. 2007. 査読有り

斎藤亮彦、飯野則昭、竹田徹朗、下条文武. 腎臓における AGE の代謝機構. 近位尿細管上皮細胞の役割. 生体の科学、p540-542, 2007. 査読なし

飯野則昭、濱ひとみ、竹田徹朗、下条  
文武、斎藤亮彦．レプチンと腎疾患．  
Annual review 腎臓、p20-23, 2007.査読  
なし

Sugano M, Yamato H, Hayashi T,  
Ochiai H, Kakuchi J, Goto S, Nishijima  
F, Iino N, Kazama JJ, Takeuchi T,  
Mokuda O, Ishikawa T, Okazaki R.  
High-fat diet in  
low-dose-streptozotocin-treated  
heminephrectomized rats induces all  
features of human type 2 diabetic  
nephropathy: a new rat model of  
diabetic nephropathy. *Nutr Metab  
Cardiovasc Dis.* 16(7):477-484. 2006.  
査読有り

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者：飯野則昭 ( IINO NORIAKI )  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・特任  
助教

研究者番号： 1 0 4 2 0 3 0 8

