

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08591

研究課題名(和文)ポドサイトが形成する血液濾過装置を支える新規アクチンリモデリング機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a novel actin remodeling mechanism that supports the filtration apparatus of blood formed by podocytes

研究代表者

山田 浩司(YAMADA, Hiroshi)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：80325092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓で血液濾過に重要なポドサイトは、基底膜を介して毛細血管を包み血液濾過装置を構成している。そのため、ポドサイトの形態・機能の維持が蛋白尿の悪化を防ぐために重要であるが、その機構は不明である。我々は、ポドサイトに発現しているダイナミン1とダイナミン2タンパク質の機能に着目した。これまでに、両タンパク質ともにポドサイトの形態・機能維持に必須であることが示されているが、その分子メカニズムは不明である。本研究では、ダイナミン1が微小管、ダイナミン2がアクチン線維の束化と安定化に働き、ポドサイトの形態と機能を支えることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓系球体ポドサイトは、血液を濾過し蛋白尿の発生を防ぐ中心的な役割を持っている。このため、ポドサイトの障害により血液濾過装置が破綻すると、透析治療が必要な慢性腎不全の進行に直結する。本研究では、ポドサイトの形態・機能の維持に重要なダイナミンによる微小管、アクチン線維束化機構の一端を明らかにできた。さらに、ダイナミンの活性化はポドサイトのアクチン細胞骨格の再構成のみならず接着能も促進することから、ポドサイトの保護や機能改善に働くダイナミンをターゲットとした創薬が大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Glomerular podocytes in kidney play important roles in filtering blood and preventing the development of proteinuria. Podocytes adhere to capillaries via a basement membrane to form an elaborated filtration apparatus of blood. Therefore, maintaining the morphology and function of podocytes is important to prevent progression of proteinuria, but the mechanism is largely unknown. We focused on the functions of dynamin 1 and dynamin 2 proteins expressed in podocytes. Both proteins have been shown to be essential for maintaining the morphology and function of podocytes, but their molecular mechanisms remained to be elucidated. In this study, we found that both dynamins are involved in the regulation of the cytoskeleton that supports podocyte morphology. Dynamin 1 and dynamin 2 bundled and stabilized microtubules and actin filaments, respectively.

研究分野：生化学

キーワード：タンパク尿 ポドサイト ダイナミン アクチン 微小管 透過型電子顕微鏡 in vitro 細胞骨格

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

腎臓糸球体のポドサイトは、血液を濾過し蛋白尿の発生を防ぐ重要な役割を持っている。ポドサイトは、基底膜を介して毛細血管を包み込むように接着している。基底膜上のポドサイトは、細胞体から太い一次突起、さらに一次突起からのび出した足突起を持ち、隣り合った足突起は、規則的に噛み合わせを作り、この間に張ったスリット膜が毛細血管内を流れる血液を濾過する。ポドサイトの障害から、足突起の噛み合わせ、そしてスリット膜が消失し血液の濾過機能が低下する。そのため、ポドサイトの一次突起、足突起、スリット膜の形態を維持することが必要であるが、その分子メカニズムについて、ほとんどわかっていない。

### 2. 研究の目的

ダイナミンは、エンドサイトーシスの際、小胞形成に働く GTPase である。我々は、ポドサイトに発現しているダイナミン 1 とダイナミン 2 に着目した。両タンパク質ともに欠失したポドサイトをもつマウスでは、ポドサイトの足突起、スリット膜が壊れて、重度の蛋白尿が発生することが報告されている (Soda et al., J. Clin. Invest., 122, 4401-4411, 2012)。しかしながら、これら 2 種のダイナミンがどのような機序で、ポドサイトの一次突起、足突起、スリット膜等の形態形成に働くのか不明である。そこで、ポドサイトにおけるダイナミン 1 及びダイナミン 2 の機能を調べた。

### 3. 研究の方法

細胞の解析には、ヒトポドサイト細胞株 (HPC) もしくはマウスポドサイト細胞株 (MPC) を用いた。ダイナミン及び関連タンパク質の細胞内局在の解析には、間接蛍光抗体法を用い、共焦点蛍光レーザー顕微鏡にて観察した。また、ヒトダイナミン 1、ラットダイナミン 2 の野生型または K562E 変異体を常法に従い過剰発現させ、間接蛍光抗体法を用いて、細胞内のダイナミン、微小管またはアクチン線維の配向等を観察した。MPC におけるダイナミン 1 タンパク質の発現抑制には、RNAi 法を用いた。ラットダイナミン 2 野生型と K562E 変異体タンパク質は、コムギ胚芽無細胞タンパク合成系を用いて調製した。ヒトダイナミン 1 タンパク質は、昆虫細胞-バキュロウイルス・タンパク質発現系により調製した。アクチン線維または微小管は、市販のキットを用いて常法に従い調製した。ダイナミンによる微小管、アクチン線維の形態の観察には、負染色と透過型電子顕微鏡 (TEM) を組み合わせた。ダイナミンによる膜変形は、負染色と透過型電子顕微鏡を組み合わせて観察した。GTPase 活性は、マラカイトグリーンを用いた比色定量法により行った。

### 4. 研究成果

(1) ポドサイトのダイナミン 1 は微小管束と共局在する。

ポドサイトのダイナミン 1 の機能を調べた。まず、MPC におけるダイナミン 1 の局在を間接蛍光抗体法により観察した。ダイナミン 1 は、細胞中心部から辺縁部に向かって放射状に配向していた。興味深いことに、微小管束も同じ配向を示しており、微小管とダイナミン 1 の相互作用が強く示唆された (図 1)。

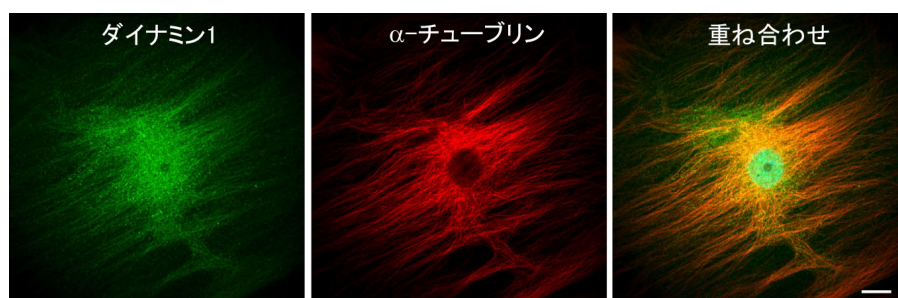


図 1: マウスポドサイト細胞株 (MPC) のダイナミン 1 は、微小管束と共局在する。スケールバー; 20  $\mu$ m

(2) ダイナミン1は、微小管束形成と微小管リッチな突起形成に必要である。

RNAi法を用いてMPCのダイナミン1の発現を抑制すると、微小管束が壊れ、微小管が分散した。さらに、微小管リッチな細胞突起が顕著に減少した。次に、ダイナミン1がMPCの微小管の安定化に働くのかを微小管の脱重合促進剤であるノコダゾールの効果を評価することにより調べた。MPCの微小管はノコダゾール処理により、その数が減少したが、ダイナミン1を強制発現させたMPCでは、微小管の分解の程度が小さくなった。これらの結果から、ダイナミン1は、MPCの微小管を安定化させ、細胞の形態及び突起形成に働くことが示唆された。

(3) ダイナミン1タンパク質は、直接微小管に結合し、微小管束を形成する。この微小管束形成は、微小管を安定化する。

次に、ダイナミン1タンパク質が微小管を束化するか否かを調べた。昆虫細胞-バキュロウイルス・タンパク質発現系を用いて調製したヒトダイナミン1と試験管内で重合させた微小管を混合し、このサンプルの微小管とダイナミン1の形態を負染色とTEMを組み合わせた観察法にて調べた。ダイナミン1は、微小管上で規則的に重合しダイナミン1が結合した微小管同士が束となった。この結果から、ダイナミン1は、直接微小管を束ねる能力があることが判明した(図2右)。

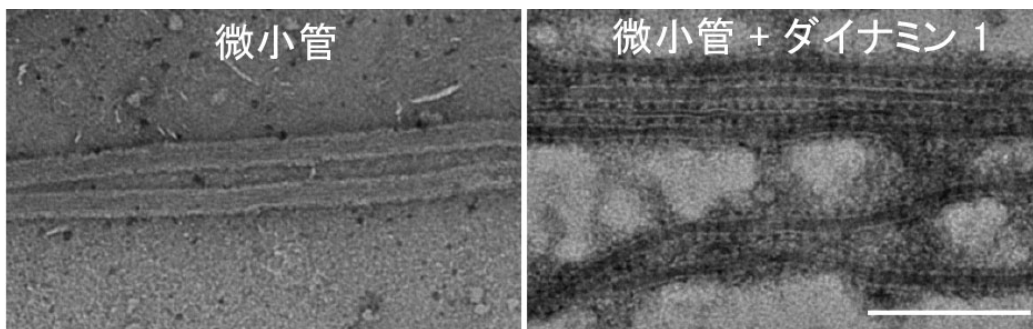


図2:試験管内で再構成した微小管(左:電顕像)。ダイナミン1は、微小管上でらせん状に重合して、さらにダイナミン1が結合した微小管同士をまとめて束化する(右:電顕像)。スケールバー;200 nm

続いて、ダイナミン1で束ねられた微小管の脱重合のキネティクスを調べた。微小管脱重合促進剤は、podophyllotoxinとCa<sup>2+</sup>イオンを用いた。いずれの脱重合促進剤の添加においても、速やかに微小管の脱重合が起こった。また、いずれの脱重合促進剤存在下においても、ダイナミン1は濃度依存的に微小管の脱重合速度を低下させた。従って、ダイナミン1は、直接微小管に結合し束化することで、微小管を安定化したと考えられる。以上の結果から、ダイナミン1が、微小管を束ねることで微小管を安定化させ、ポドサイトの形態、機能維持に働いていることが明らかになった(Laら, FASEB Journal, 34, 16449-16463, 2020)。

(4) ヒトの神経変性疾患であるCharcot-Marie-Tooth病の原因遺伝子の一つであるダイナミン2におけるK562E変異体の発現は、ポドサイトのストレスファイバー形成とアクチン線維の形態を異常にする。

我々は、ダイナミン2K562E変異体をヒトポドサイト細胞株(HPC)に強制発現させたところ、ストレスファイバー形成とアクチン線維の形態に異常が発生することを発見した。

(5) ダイナミン2K562E変異はポドサイトのストレスファイバー形成を初期段階で阻害する。

この変異体を発現したHPCのアクチン線維をアクチン重合阻害剤であるサイトカラシンDを用いて処理し、一旦ストレスファイバーを壊した後、培養液からサイトカラシンDを除いて、再び形成されるストレスファイバーを観察した。ダイナミン2K562E変異体を発現したHPC

は、ダイナミン2野生型を発現したHPCに比較して、ストレスファイバーの再形成が、顕著に低下していることがわかった。従って、ダイナミン2K562E変異は、ストレスファイバー形成の初期の段階を阻害していることが示唆された。

(6)ダイナミン2は直接アクチン線維を束化する。

次に、ダイナミン2K562E変異体が、直接アクチン線維の形態に影響を与えるのか否かを、*in vitro*再構成系を用いて調べた。ダイナミン2野生型もしくはK562E変異体タンパク質は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系にて調製した。試験管内で重合させたアクチン線維とダイナミン2タンパク質を混合したあと、サンプルを負染色しTEMを用いて、アクチン線維の形態を観察した。ダイナミン2野生型、K562E変異体は、ともにアクチン線維束を形成した(図3上段)。ダイナミン2野生型により束化されたアクチン線維束を詳細に観察したところ、らせん状に重合したダイナミン2のリン部にアクチン線維が結合して、アクチン線維束が形成されていることが判明した(図3上段)。

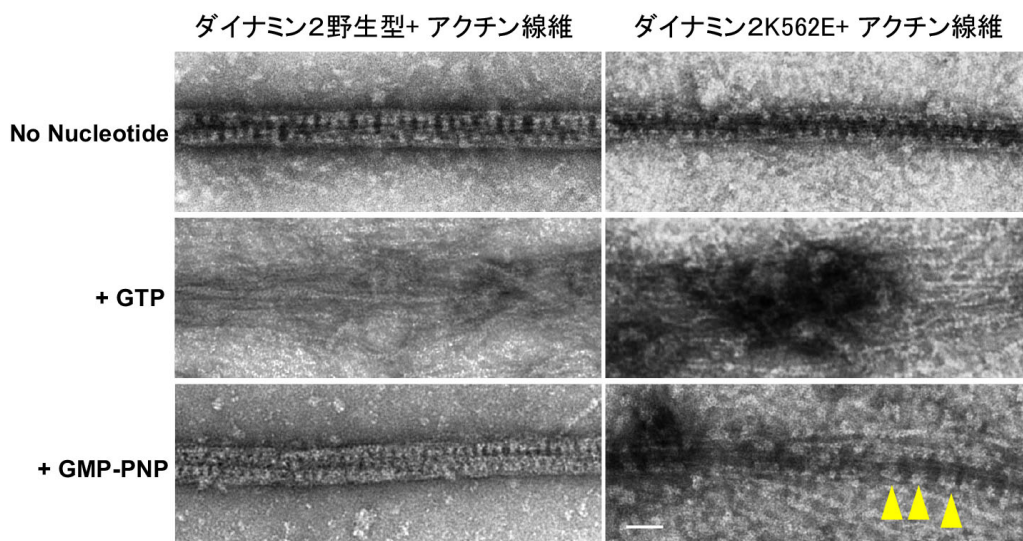


図3:ダイナミン2によるアクチン線維束。ダイナミン2は野生型(上段左)、変異体(上段右)共にアクチン線維束を形成する(電顕像)。ダイナミンによるアクチン線維束は、GTPの添加により速やかに壊れ、アクチン線維が分散する(中段)。GTPの非加水分解アナログGMP-PNPを添加すると、ダイナミン変異体のらせん状重合体は、クラスター化する(黄色矢頭)。ダイナミン2野生型のらせん状重合体の間隔は、わずかに狭くなる(下段左)。スケールバー;40 nm

(7)ダイナミンにより束化されたアクチン線維束は、ダイナミンのGTPase活性により壊れ分散する。

ダイナミン2により形成されたアクチン線維束は、GTPの添加により速やかに壊れた(図3中段)。さらに、GTPの非加水分解アナログであるGMP-PNPを加えると、アクチン線維束の内側に存在するダイナミン2K562E変異体のらせん状重合体のクラスター化が顕著に観察された(図3下段右)。

図3の条件下、ダイナミン2のGTPase活性を測定した。ダイナミン2野生型のGTPase活性は、アクチン線維の存在により、ダイナミン2野生型では約6倍、変異体では約3倍そのGTPase活性が上昇した。従って、ダイナミン2野生型、K562EはともにGTPの加水分解に共役して構造変化を起こし、アクチン線維の束化、脱束化を調節している可能性が強く示唆された。

(8)ダイナミン2K562E変異体は脂質膜に結合できない。

ダイナミン2K562E変異体は、細胞膜を模倣したphosphatidylinositol(4,5)bisphosphateを含む人工脂質膜にほとんど結合できないことがわかった。さらに、脂質膜依存性

の GTPase 活性も有していなかった。従って、この変異体は、細胞膜とアクチン線維束との間でクロスリンクできないと考えられる。以上の結果から、ダイナミン 2K562E 変異体は、自己重合と細胞膜への結合能が顕著に低下しているために、細胞内のストレスファイバーを含むアクチン線維束を正常に形成できないことにつながったと結論した。本研究をまとめ、論文として報告した（濱崎ら, *Front. Cell. Dev. Biol.*, 10, 884509, 2022）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Fujise Kenshiro, Okubo Mariko, Abe Tadashi, Yamada Hiroshi, Takei Kohji, Nishino Ichizo, Takeda Tetsuya, Noguchi Satoru	4. 巻 43
2. 論文標題 Imaging based evaluation of pathogenicity by novel DNM2 variants associated with centronuclear myopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 169 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.24307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Li Jianzhen, Fujise Kenshiro, Wint Haymar, Senju Yosuke, Suetsugu Shiro, Yamada Hiroshi, Takei Kohji, Takeda Tetsuya	4. 巻 571
2. 論文標題 Dynamin 2 and BAR domain protein pacsin 2 cooperatively regulate formation and maturation of podosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 145 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakane Ayuko, Yano Taka-aki, Uchihashi Takayuki, Horikawa Kazuki, Hara Yusuke, Imoto Issei, Kurisu Shusaku, Yamada Hiroshi, Takei Kohji, Sasaki Takuya	4. 巻 4
2. 論文標題 JRAB/MICAL-L2 undergoes liquid-liquid phase separation to form tubular recycling endosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02080-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujise Kenshiro, Okubo Mariko, Abe Tadashi, Yamada Hiroshi, Nishino Ichizo, Noguchi Satoru, Takei Kohji, Takeda Tetsuya	4. 巻 296
2. 論文標題 Mutant BIN1-Dynamin 2 complexes dysregulate membrane remodeling in the pathogenesis of centronuclear myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.015184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 The Mon La, Tachibana Hiromi, Li Shun-Ai, Abe Tadashi, Seiriki Sayaka, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Takeda Tetsuya, Ogawa Daisuke, Makino Shin-Ichi, Asanuma Katsuhiko, Watanabe Masami, Tian Xuefei, Ishibe Shuta, Sakane Ayuko, Sasaki Takuya, Wada Jun, Takei Khoji, Yamada Hiroshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Dynamin 1 is important for microtubule organization and stabilization in glomerular podocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 16449-16463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001240RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 The Mon La, Yamada Hiroshi, Seiriki Sayaka, Li Shun-Ai, Fujise Kenshiro, Katsumi Natsuho, Abe Tadashi, Watanabe Masami, Takei Khoji	4. 巻 45
2. 論文標題 Internalization of AMPA-type Glutamate Receptor in the MIN6 Pancreatic $\beta$ -cell Line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 121-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.20020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山田 浩司
2. 発表標題 系球体足細胞 (ポドサイト) におけるダイナミンによる微小管制御と形態形成
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 浩司
2. 発表標題 ダイナミンによる細胞骨格制御
3. 学会等名 愛媛大学応用化学セミナー・ミニシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 山田 浩司
2. 発表標題 血液る過に重要な新規の腎臓病治療標的タンパク質 『ダイナミン1』の発見
3. 学会等名 "未来へのバイオ技術" 勉強会(バイオインダストリー協会)(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱崎 英理子, 安岡 宏樹, 和木田 夏輝, 阿部 匡史, 竹田 哲也, 竹居 孝二, 山田 浩司
2. 発表標題 ダイナミン2の自己重合と膜との相互作用は糸球体ポドサイトのアクチン制御に重要である
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安岡 宏樹, 西井 尚子, 原田 結加, 宮地 孝明, 阿部 匡史, 竹田 哲也, 和田 淳, 竹居 孝二, 山田 浩司
2. 発表標題 糸球体ポドサイトからのグルタミン酸の放出と開口放出関連タンパクの探索
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藪 彩夏, 安岡 宏樹, 片野坂 友紀, 阿部 匡史, 竹田 哲也, 竹居 孝二, 山田 浩司
2. 発表標題 ダイナミン1は微小管の配向を調節しTRPV2の細胞膜移行を制御する
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	竹居 孝二  (Takei Kohji)  (40322226)	岡山大学・学術研究院医歯薬学域・教授   (15301)	
研究 分担者	浅沼 克彦  (Asanuma Katsuhiko)  (60449064)	千葉大学・大学院医学研究院・教授   (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------