

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 2日現在

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591021
 研究課題名（和文）スリット膜と相補う密着結合の構造と機能

研究課題名（英文）Structure and function of tight junctions involved in slit diaphragms

研究代表者
 矢尾板 永信（YAOITA EISHIN）
 新潟大学 医歯学系 准教授
 研究者番号：00157950

研究成果の概要（和文）：ポドサイトの細胞間接着装置は、糸球体濾過の最終関門として重要な役割を果たしている。その細胞間接着装置のうち、スリット膜については多くの研究がなされているが、もう一つの接着装置である密着結合は、その構成成分についてさえも、未だ十分な解析が行われていない。本研究では、その主要な構成成分がクロードイン5であり、スリット膜構成成分のネフリンと結合しうることを示し、密着結合形成がクロードイン5の発現増加ではなく分布の変化によって生じることを示した。

研究成果の概要（英文）：Tight junctions are the main intercellular junctions of podocytes of the renal glomerulus under nephrotic conditions. Their requisite components, claudins, still remain to be identified. Absolute quantitative real-time PCR using cDNA of isolated rat glomeruli showed that claudin-5 was the most abundant claudin expressed in glomeruli. In situ hybridization and immunolocalization studies revealed that claudin-5 was localized mainly in podocytes. Claudin-5 protein was observed on the entire surface of podocytes including slit diaphragms, and was inclined to be concentrated on tight junctions in puromycin aminonucleoside nephrosis. Immunoprecipitation studies using anti-claudin-5 and glomerular lysates revealed the association of claudin-5 and nephrin. It is concluded that claudin-5 is a main claudin expressed in podocytes and that the formation of tight junctions in the nephrosis may be due to local recruitment of claudin-5 rather than due to total upregulation of the claudin protein levels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学
 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：腎臓、足細胞、細胞間結合、密着結合、スリット膜

1. 研究開始当初の背景

ポドサイトのスリット膜は、糸球体濾過・糸球体構造の維持に重要な役割を演じてい

る。また、スリット膜は、細胞膜タンパク質の apical と basolateral の境となっていること、ZO-1 を含むこと、細胞極性を制御する

aPKC-PAR 複合体が局在することから、スリット膜は密着結合(tight junction)と多くの共通点を持つ細胞間結合装置であることが示されている。スリット膜の他に、ポドサイト間には密着結合そのものも存在する。密着結合はギャップ結合と近接して存在し、密着結合を中心とした細胞間結合複合体を形成している。ポドサイトの発生分化、傷害時において、これら細胞間結合はダイナミックに変動する。ポドサイトの分化に伴って、細胞間結合複合体は消失しスリット膜に置き換わり、ポドサイトの傷害時、スリット膜は細胞間結合複合体に置き換わる。また、硫酸プロタミンの腎灌流によって、スリット膜のみが存在する状態から、数分以内に密着結合が形成されることから、スリット膜の近傍に密着結合の構成成分がすでに存在しているものと想定されている。密着結合を中心とする細胞間結合複合体は、生理的な状態でも存在し、スリット膜と混在連続して存在している。これらのことは、スリット膜と密着結合はダイナミックに移行し合うことを示している。

我々は、ポドサイトの糸球体濾過と糸球体構造の維持における役割を明らかにするためには、スリット膜・細胞間結合複合体を含めたポドサイト細胞間結合装置全体を理解する必要があると考えている。しかしながら、精力的に解析が進められているスリット膜とは対照的に、細胞間結合複合体の構成成分、およびその機能については、ほとんど解明されていない。細胞間結合複合体の解析の第一段階として、我々はその構成分子の同定を試みてきた。その結果、以下の所見を見出し報告してきた。1) ポドサイト傷害時に形成される細胞間結合複合体には、adherens junctionの構成成分が検出されない(Nephrol Dial Transplant 17(Suppl9):16-19, 2002)。2) ギャップ結合の主要なコネクシンはコネクシン43であり、ポドサイト傷害時に迅速にリン酸化、発現亢進する(Am J Pathol 161:1597-1606, 2002)。3) 密着結合は、CAR(Lab Invest 83:901-911, 2003)、Fat1(Kidney Int 68:542-51, 2005)、ポドシン(J Am Soc Nephrol 18:2525-2533, 2007)、クロードイン6を構成成分として含む。これら構成成分の検討とZO-1の報告から、密着結合のほとんどの構成成分がスリット膜自体およびその近傍に実際に存在することが明らかになった。

密着結合の主要成分であるクロードインは24種類あり、通常1つの細胞に2種類以上が発現している。我々はクロードイン6の存在を報告したが、クロードイン6はマウスとラットのポドサイトに認められるものの、ヒトのポドサイトには検出できない。そのため、他のクロードインがポドサイトに発現している可能性が考えられていた。

2. 研究の目的

ポドサイトの細胞間結合複合体の構成分子と複合体形成機序を、密着結合を中心に解析する。(1) クロードイン6以外のクロードインがどの程度ポドサイトに発現しているのか。(2) そのクロードインが生理的な条件下でスリット膜とどのような位置関係にあるのか。(3) スリット膜の構成分子とどのように関係しているのか。これらを調べることによって、ポドサイト細胞間結合全体がどのように制御され、機能しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 動物:成熟したラットと生後2日のラットを用いた。生後2日のラット腎は、完全に成熟していなく、発生のすべての過程の糸球体が存在している。病的状態は、ラットに puromycin aminonucleoside を投与し、足細胞を傷害してネフローゼ症候群を引き起こした(PAN 腎症)。

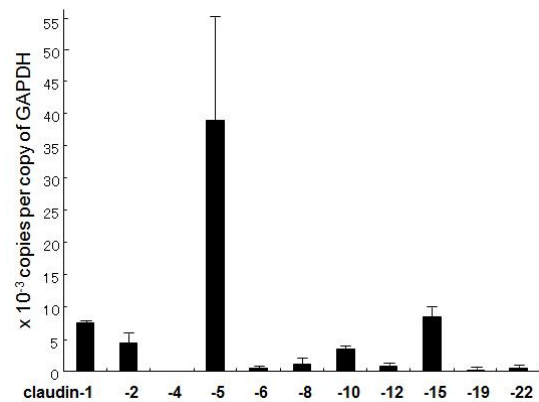
(2) 遺伝子発現: real time-PCRにて、ラット単離糸球体に発現する各種クロードインの絶対的定量を行った。

(3) 抗体特異性の検討:糸球体タンパク質を用いた免疫沈降物を質量分析で分析した。

(4) 抗体による検索:糸球体タンパク質の Western blot、腎臓切片の蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法を行った。また、免疫沈降物中のスリット膜成分を Western blot で解析した。

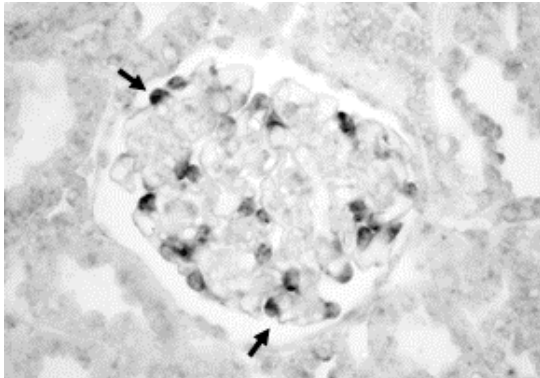
4. 研究成果

(1) 糸球体に発現する主要なクロードインはクロードイン5である:単離糸球体よりcDNAを用い、各々のクロードインの一定濃度の標準液を基準として、real-time PCRから、各々のクロードイン遺伝子の絶対的定量を行ったところ、下図のようにクロードイン5が最も多く発現していることが明らかとなった。

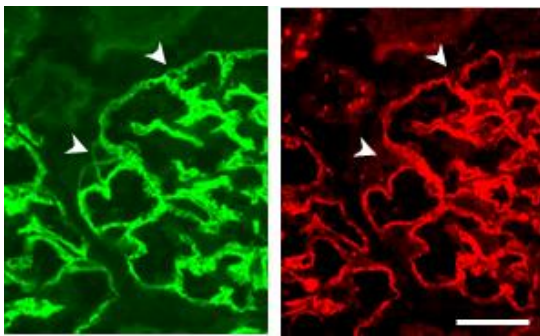


(2) 糸球体の中でクロードイン5はポドサイトに発現している:糸球体内でクロードイン5を発現している細胞を同定するため、

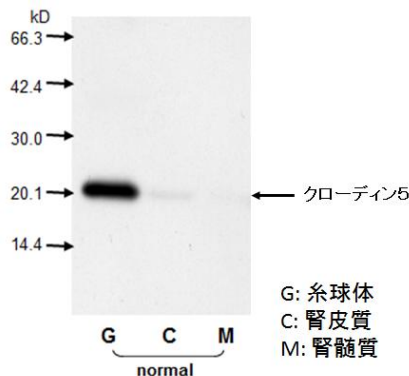
in situ hybridization と二重蛍光抗体法を行った。in situ hybridization では、下図の矢印のように、糸球体最外層の細胞、すなわちポドサイトがクロードイン5陽性となっていた。



抗クロードイン5抗体（緑）と抗ZO-1抗体（赤、スリット膜を染色する）を用いた二重染色では、下図のように、クロードイン5はZO-1 とほぼ同じ局在を示すことに加え、矢頭のようにポドサイトを縁取るような局在を示した。

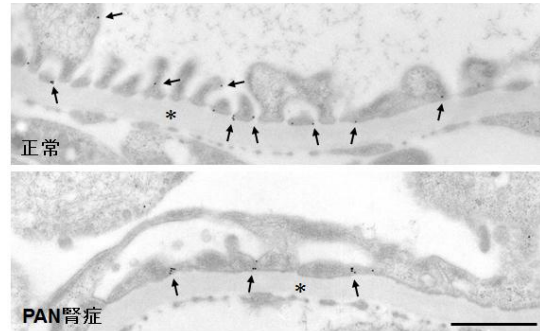


(3) 用いた抗体は糸球体においてクロードイン5を認識している：通常クロードインの分布は細胞接着に局在する。しかし、用いた抗体 (Zymed laboratories, clone: 4C3C2) では、細胞を縁取るような染色をしたため、その特異性を検討した。糸球体可溶化タンパク質を用いて、Western blot と免疫沈降の質量分析解析を行った。Western blot では下図のように、予想される位置に一本のバンドは確認され、それ以外のバンドは見られなかった。

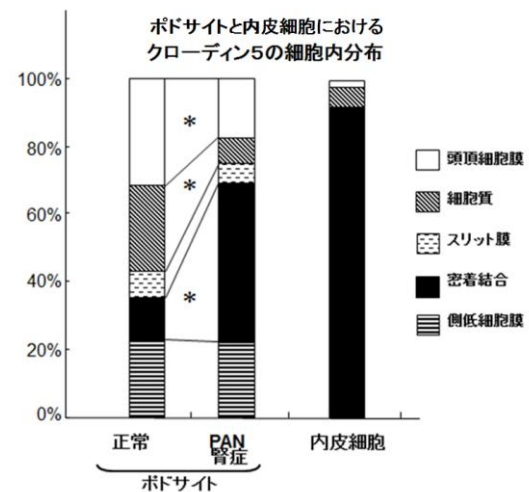


質量分析解析でも、クロードイン5のみが確認され、他のクロードインを検出できなかった。これらから、この抗体がクロードイン5を特異的に認識していることが明らかとなった。

(4) クロードイン5はポドサイトの細胞膜全周性に分布している：ポドサイトにおけるクロードイン5の分布を調べるため、免疫電顕を行い、PAN腎症との比較定量を行った。下図の矢印で示したように、正常では、クロードイン5はスリット膜を含む細胞膜全体

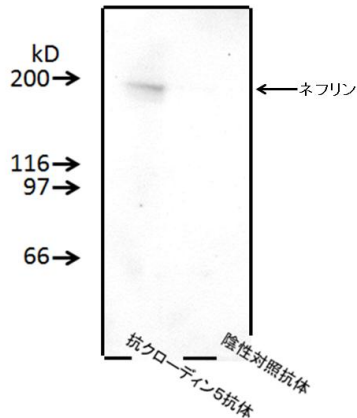


(* : 糸球体基底膜、実線 : 1μm)



に分布し、PAN腎症ではそれが密着結合に分布が偏っていることが分かった。また、Western blot および real time-PCR でPAN腎症では、クロードイン5は減少することはあっても、有意な増加を示すことはなかった。これらから、密着結合形成がクロードイン5の発現増加ではなく分布の変化によって生じることが考えられた。

(5) クロードイン5はネフリンと結合する：免疫電顕より正常でも一部のクロードイン5がスリット膜に存在するため、クロードイン5の抗体を用い、可溶化した糸球体との免疫沈降を行い、沈降物の中にスリット膜の成分の有無を検討した。抗ネフリン抗体のみが、下図のように沈降物の中に陽性であった。抗ネフ1抗体、抗ポドシン抗体では、有意な所見は得られなかった。



以上の所見から、ポドサイトの主要なクローデインがクローデイン5であり、スリット膜構成成分のネフリンと結合しうること、密着結合形成がクローデイン5の発現増加ではなく分布の変化によって生じることが示された。これにより、密着結合とスリット膜が分子レベルでより密接に関係していることが明らかになった。

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5件)

- ① Zhang Y, Yoshida Y, Xu B, Magdeldin S, Fujinaka H, Liu Z, Miyamoto M, Yaoita E, Yamamoto T. Comparison of human glomerulus proteomic profiles obtained from low quantities of samples by different mass spectrometry with the comprehensive database. *Proteome Science*, 査読有, Vol.9, No.1, 2011, pp.47-57
- ② Xu B, Zhang Y, Zhao Z, Yoshida Y, Magdeldin S, Fujinaka H, Ismail TA, Yaoita E, Yamamoto T. Usage of electrostatic eliminator reduces human keratin contamination significantly in gel-based proteomics analysis. *Journal of Proteomics*, 査読有, Vol.74, No.7, 2011, pp1022-1029
- ③ Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S, Tamura A, Nameta M, Zhang Y, Fujinaka H, Magdeldin S, Xu B, Narita I, Yamamoto T. Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell and Tissue Research*, 査読有, Vol.343, No.3, 2011, pp637-648
- ④ Sekiguchi S, Suzuki A, Asano S, Nishiwaki-Yasuda K, Shibata M, Nagao S, Yamamoto N, Matsuyama M, Sato Y, Yan K, Yaoita E, Itoh M. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 査読有, Vol.300, No.4, 2011, ppF848-F856

- ⑤ Zhang Y, Yoshida Y, Nameta M, Xu B, Taguchi I, Ikeda T, Fujinaka H, Mohamed SM, Tsukaguchi H, Harita Y, Yaoita E, Yamamoto T. Glomerular proteins related to slit diaphragm and matrix adhesion in the foot processes are highly tyrosine phosphorylated in the normal rat kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 査読有, Vol.25, No.6, 2010, pp1785-1795

[学会発表] (計3件)

- ① 矢尾板永信. 初代培養におけるポドサイトの性質. 第54回日本腎臓学会学術総会, 2011.6.11, 横浜
- ② 矢尾板永信. 糸球体培養. 第53回日本腎臓学会学術総会, 2010.6.18, 神戸
- ③ 矢尾板永信. Adherens junction proteins in glomerular podocytes of quail kidney. 2010 Experimental Biology, 2010.4.26, Anaheim, CA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢尾板 永信 (YAOITA EISHIN)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：00157950

(2) 研究分担者

吉田 豊 (YOSHIDA YUTAKA)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：40182795
山本 格 (YAMOTO TADASHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30092737

(3) 連携研究者

なし