

令和 6 年 9 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19484

研究課題名（和文）微小管束による腎系球体ポドサイトの形態形成・維持安定化・メンテナンス機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of morphogenesis, maintenance and stabilization, and maintenance mechanism of glomerular podocytes by microtubule bundles

研究代表者

竹居 孝二（Kohji, Takei）

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：40322226

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：ダイナミン1による微小管の束化がポドサイトの一次突起形成に寄与することを見出した。ダイナミンのPHドメインに存在する微小管との結合部位を特定するとともに、微小管周囲にダイナミンがらせん状に重合した超複合体の立体構造を決定した。さらに、ダイナミン2によるアクチン制御機構を明らかにした。ポドサイトを分化させるとアクチン再編により細胞が伸展するが、その際、ダイナミン2に富む液滴が形成された。液滴はアクチン線維安定化により減少し、線維束崩壊により増加した。慢性腎臓病マウスの変性ポドサイトにも液滴が出現した。以上より、ダイナミン2の液滴はアクチン線維束の制御に関わることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポドサイトは腎臓のろ過フィルターとして働く細胞であり、変性により慢性腎臓病（CKD）をきたす。ポドサイトがフィルターとして機能するためには、細胞骨格が正常に制御され、特異的形態が維持されなければならないが、その機構は不明であった。本研究ではダイナミン1が微小管束化によりポドサイトの一次突起形成を支持し、ダイナミン2がアクチン細胞骨格の再編を担うことを明らかにした。近年CKD患者は急増しており国内で1300万人を超える国民病であるが、腎移植以外の根治療法が存在せず、末期CKDでは人工透析が必要となる。本研究成果はCKD克服につながる分子基盤の一端を明らかにした点で、学術的、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：We found that bundling of microtubules by dynamin 1 contributes to the formation of primary processes of podocytes. We identified the microtubule-binding site of in the PH domain of dynamin 1, and elucidated the three-dimensional structure of the super complex in which dynamin is polymerized in a spiral shape around microtubules by cryo-electron microscopy. Furthermore, we demonstrated the mechanism of re regulation of actin cytoskeletons by dynamin 2. When podocytes are differentiated, the cells extend outward by reorganizing the actin cytoskeletons actin. In the cell differentiation, droplets enriched with dynamin 2 are formed. The number of droplets was decreased by stabilizing actin filament and collapsing the stress fibers resulted in the increase of the droplet. Dynamin droplets also appeared in degenerated podocytes in chronic kidney disease model mice. It was strongly suggested that dynamin 2 droplets are involved in the control of actin fiber bundles.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ポドサイト 慢性腎臓病 微小管 ダイナミン

1. 研究開始当初の背景

ポドサイトは腎糸球体のろ過フィルターとしての役割を果たす細胞である。ポドサイトは細胞体から延びる2-3本の一次突起と、一次突起から延びる多数の足突起をもつ特異的形態を有しており、隣接するポドサイトと足突起を嵌合させて糸球体毛細血管を覆い、足突起嵌合部の狭小な細胞間隙に形成されたスリット膜がろ過フィルターの役割を果たす。慢性腎臓病 (CKD) ではポドサイトが変性、脱落するためにろ過フィルター機能が著しく低下し、タンパク尿をきたす。ポドサイトがろ過フィルターとして機能するためには、ポドサイトの細胞骨格が正しく制御され、その特異的形態が維持されなければならないが、その機構は不明であった。

我々は、ダイナミン GTP アーゼが微小管を束化すること、微小管の束化がポドサイト分化に伴う突起形成を促進すること、さらに顕著なアセチル化による微小管安定化が関与することを見出した (The Mon La et al. FASEB J. 2020)。これにより、ポドサイトの形態形成・安定化に微小管が制御されることが必須であることが判ったが、その分子機構は依然として未解明であった。また、ポドサイトの足突起に豊富に存在するアクチンについても、これまでの研究は足突起のみにフォーカスしたものが殆どであった。ポドサイトの分化、特異的形態の維持・安定化におけるアクチン細胞骨格の役割を解明するためには、足突起だけでなく細胞体や一次突起を含めた細胞全体のアクチン制御機構の全容を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、

①ポドサイトにおける微小管束の構造と形成機構の解明

②ポドサイトにおけるアクチン骨格の制御機構の解明

の2点を具体的な研究目標として解析を進め、最終的にはポドサイトの特異的形態の形成、維持、安定化の機構を分子レベルで明らかにする。

これらのアプローチにより、ポドサイト障害を特徴とする CDK の分子病態解明や、CDK の新規治療ターゲットの発見にもつながる分子基盤の構築を目指した。

3. 研究の方法

実験は *in cellulo* および *in vitro* の解析を中心に進めた。*in cellulo* 解析にはマウスポドサイト株 MPC、ヒトポドサイト株 HPC を用い、蛍光免疫染色法、電子顕微鏡によりポドサイト細胞骨格や細胞膜の形態、ダイナミン等の機能分子の局在を観察した。機能解析は、蛍光ラベルした野生型および疾患変異ダイナミンの強制発現、RNAi によるノックダウンなどにより、ポドサイトの細胞骨格の変化を観察、解析した。*in vitro* 解析のためには、小麦胚芽無細胞系、バキュロウイルス-昆虫細胞系、あるいは大腸菌を用いて、野生型および変異型ダイナミン1およびダイナミン2を発現、精製し、アクチン線維、微小管、あるいはリポソーム (人工脂質膜) と反応させ、蛍光免疫染色法、電子顕

微鏡により形態的变化を解析した。

4. 研究成果

1. ダイナミン1による微小管ダイナミクス制御機構の解明

1) ダイナミン1と微小管との結合部位

我々は先行研究により、ダイナミン1による微小管の束化がポドサイトの突起形成に寄与することを見出すとともに、精製ダイナミン1と微小管を*in vitro*で反応させて微小管束を再構成した (La et al., FASEB J 2020)。この*in vitro*再構成系を用いて、ダイナミン1と微小管との結合部位を決定した。精製ダイナミン1により形成された微小管束は蛍光顕微鏡および電子顕微鏡により観察された。ダイナミン1のプレクストリン相同 (PH) ドメインのみを用いた場合も、全長のダイナミン1の場合と同様に微小管の束化が認められた (図1)。さらに、ダイナミン1のPHドメイン、プロリンリッチ (PR) ドメインに対応する合成ドデカペプチドを用いた結合阻害実験により、ダイナミンの微小管結合部位がダイナミン1のPHドメインに存在することを明らかにした。この研究成果を、ダイナミン1と微小管の結合阻害による神経シナプス機能の変化を神経電気生理学的に調べた高橋智幸教授、堀哲也博士(沖縄科学技術大学院大学)との共同研究として、論文発表した (Hori, et al., eLife. 2022)

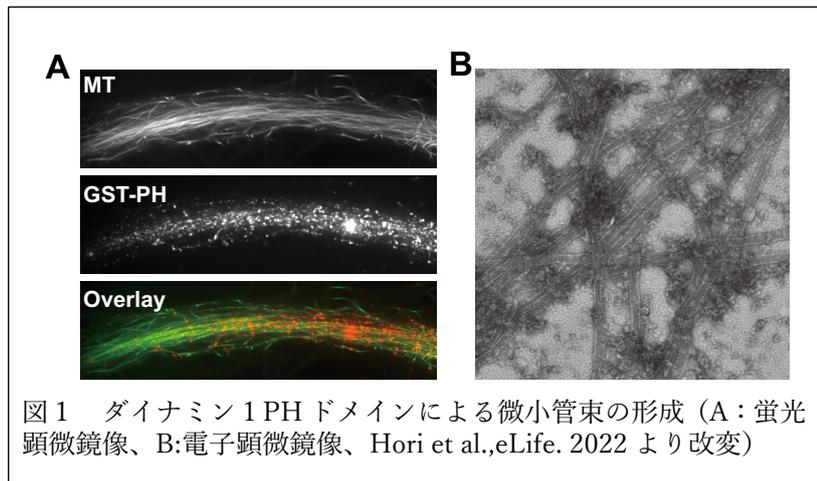


図1 ダイナミン1 PHドメインによる微小管束の形成 (A: 蛍光顕微鏡像、B: 電子顕微鏡像、Hori et al., eLife. 2022 より改変)

2) 微小管-ダイナミン1超複合体の立体構造

吉川雅英博士、佐々木諒平大学院生(東京大)との共同研究により、微小管-ダイナミン超複合体の立体構造を解明した。精製チューブリンおよびダイナミン1を用いて*in vitro*で微小管-ダイナミン1超複合体を再構成させ、クライオ電子顕微鏡による構造解析を進めた。その結果、微小管上にらせん状に重合したダイナミン1の構造が解明された。微小管とらせん状ダイナミン1重合体との間には緊密な結合部位は認められず、GTP存在下ではダイナミンのらせん重合体のみが構造変化することが確認された。以上より、ダイナミン1は微小管上でその周囲にらせん状に重合するものの、微小管との結合は緩く、ダイナミン1 PHドメインの位置もフレキシブルであることが判った。

3) ダイナミン1による微小管安定化の生理的意義

ダイナミン1が微小管依存性の小胞輸送に及ぼす影響を細胞レベルで解析した。血清刺激によりラッフル形成させた肺癌 H1299 細胞をモデル細胞として、カルシウムチャンネル TRPV2 のラッフル膜への輸送を蛍光免疫染色とカ

ルシウムイオンの細胞内流入を指標に調べた。ダイナミン1をノックダウン細胞では微小管束が減少し TRPV2 のラッフル膜への移行が減少したことから、ダイナミンに1による微小管の安定化は微小管依存性の小胞輸送の効率に影響する可能性が示唆された。

2. ダイナミン2によるアクチン制御機構の解明

1) ダイナミン2によるアクチン線維束形成

ダイナミン2によるアクチン制御機構を解明するため、ヒトポドサイト株 HPC に野生型ダイナミン2およびシャルコー・マリー・ツース病 (CMT) 変異ダイナミン2 K562Eを発現させ、アクチンの変化を調べた。ダイナミン2 K562E発現細胞では異常なアクチンクラスターが形成され、ストレスファイバー再形成能も低かった (図2)。ダイナミン2を調製し、*in vitro*でアクチン、および膜に対する性状を調べたところ、野生型に比べK562Eによるアクチン線維束化能はより少なかった。K562Eは自己重合能、膜結合能、

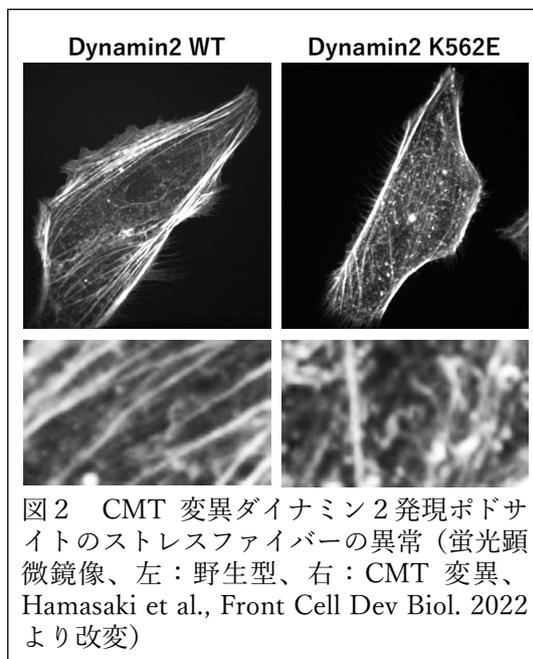


図2 CMT 変異ダイナミン2発現ポドサイトのストレスファイバーの異常 (蛍光顕微鏡像、左:野生型、右:CMT 変異、Hamasaki et al., Front Cell Dev Biol. 2022 より改変)

膜変形能も顕著に低かった。野生型ダイナミン2とアクチンをリポゾーム存在下で反応させると、太いアクチン線維束を形成されたが、K562Eではその形成は少なかった。精製タンパクを用いた *in vitro*再構成系による解析では、K562Eのアクチン線維束化能は野生型より少なく、膜結合能、膜変形能、自己重合能は顕著に低かった。リポゾームと野生型ダイナミン2存在下では、アクチン線維は太い線維束を形成したが、K562Eではその形成は少なかった。以上より、ダイナミン2の脂質膜に対する親和性と自己重合能がポドサイトにおけるアクチン束化に必要なことを明らかにした (Hamasaki et al., Front Cell Dev Biol. 2022)。

2) ダイナミン2液滴によるアクチン細胞骨格の制御

ポドサイトを分化させるとストレスファイバーの配向が再編されるとともに細胞が伸展するが、その際、ダイナミン2に富む液滴が形成されることを発見し (図3)、その特性を調べた。分化ポドサイトにダイナミン活性化剤を添加すると、アクチン線維束が安定化され、ストレスファイバーはより明瞭になり、規則的な配向を示し

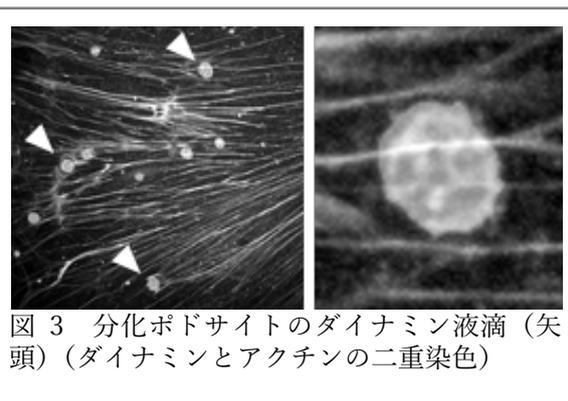


図3 分化ポドサイトのダイナミン液滴 (矢頭) (ダイナミンとアクチンの二重染色)

た。一方、ストレスファイバー付近に存在していたダイナミン液滴は激減した。ポドサイトを高濃度グルコースで処理すると、ストレスファイバーが減少し、ダイナミン液滴が増加した。さらに、CKDモデルマウスの変性ポドサイトにおいて、アクチン、ダイナミンに富む液滴様構造が特異的に出現することを見出した。以上より、ポドサイトにおいて、ダイナミン2液滴の出現、消失と、アクチン線維束の形成、消失は、相互に代償性を持つことが強く示唆された。アクチン制御に伴うダイナミンの分子動態とダイナミン液滴の動態をリアルタイム解析するために、佐藤あやの博士（岡山大学）との共同研究により、ダイナミン-GFPを恒常発現するマウスポドサイト株を樹立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamada H, Abe T, Nagaoka H, Takashima E, Nitta R, Yamamoto M, Takei K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Recruitment of Irgb6 to the Membrane is a Direct Trigger for Membrane Deformation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 992198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2022.992198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hori, T., Eguchi, K., Wang, H.Y., Miyasaka, T., Guillaud, L., Taoufiq, Z., Mahapatra, S., Yamada, H., Takei, K., Takahashi, T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Microtubule assembly by tau impairs endocytosis and neurotransmission via dynamin sequestration in Alzheimer's disease synapse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e73542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.73542.	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 Hamasaki, E., Wakita, N., Yasuoka H., Nagaoka, H., Morita, M., Takashim, E., Uchihashi, T., Takeda, T., Abe, T., Saleem, M.A., Ogo, N., Asai, A., Narita, A., Kohji Takei, K., Yamada, H.	4. 巻 -
2. 論文標題 The lipid-binding defective dynamin 2 mutant in Charcot-Marie-Tooth disease impairs proper actin bundling and actin organization in glomerular podocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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, 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 2021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 Dynamain 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 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹居孝二・山田浩司
2. 発表標題 ダイナミンによる微小管制御と糸球体ポドサイトの形態形成
3. 学会等名 第74回 細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohji Takei, Tadashi Abe, Tetsuya Takeda, Hiroshi Yamada
2. 発表標題 Allosteric changes of hecto-scale population of dynamain GTPases provide in dynamic regulation of membranes and cytoskeletons
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部匡史、山田浩司、長岡 ひかる、高島英造、仁田亮、山本雅裕、竹居孝二
2. 発表標題 Recruitment of Irgb6 to the Membrane Directly Triggers Membrane Deformation
3. 学会等名 第95回日本生化学学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹居孝二・浅沼克彦・山田浩司
2. 発表標題 分化ポドサイトにおけるダイナミン1の機能
3. 学会等名 第6回ポドサイト研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田浩司・内橋貴之・成田哲博・竹居孝二
2. 発表標題 ポドサイトにおけるダイナミン2によるアクチン制御にはダイナミン2の適切な自己重合と膜との相互作用が必要である
3. 学会等名 第6回ポドサイト研究会
4. 発表年 2022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 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

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 系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

〔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

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