

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590226

研究課題名(和文)多細胞動物の足細胞におけるスリット膜の進化

研究課題名(英文)Evolutionary diversity of podocyte slit diaphragm in metazoans

研究代表者

市村 浩一郎 (Ichimura, Koichiro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10343485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：足細胞は無脊椎動物から脊椎動物にいたる動物群に広く存在し、原尿産生装置を構成する。本研究では足細胞が作る濾過バリア構造(スリット膜)の進化過程を構成分子種ならびに超微形態の観点から明らかにした。哺乳類におけるスリット膜の主要構成分子であるネフリンの局在をメダカおよびゼブラフィッシュの前腎系球体において精査したところ、哺乳類と同様に、スリット膜の形成にネフリンが必須であることが判明した。さらに、タイト結合構成分子の一種であるMpp5aがゼブラフィッシュの前腎系球体足細胞のスリット膜部に局在することも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Slit diaphragm (SD) is a highly specialized intercellular junction between podocyte foot processes and plays a crucial role in the formation of the filtration barrier. In this study, we examined the developmental localization of Nephtrin, an essential component of SD, in the pronephric glomerulus of zebrafish and medaka. In the mature glomerulus of both fish, Nephtrin is localized along the glomerular basement membrane like in mammals, indicating that Nephtrin is localized at the SD. Nephtrin was localized along the cell surface of immature podocytes, but as different localization patterns. In zebrafish, Nephtrin signal bordered the lateral membrane of podocytes, which were columnar in shape as are in rat immature podocytes. However, in medaka immature podocytes, Nephtrin was localized in a punctate pattern among podocyte cell bodies. These findings suggest that Nephtrin is needed to be integrated to the membrane before the formation of SD and then move to the proper site to form SD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：比較解剖学 比較細胞組織学 腎臓 系球体 足細胞 スリット膜 電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

足細胞 podocyte は無脊椎動物から脊椎動物にいたる動物群（真体腔類）に広く存在し、原尿産生装置の主要部分を構成する。足細胞の基本構造は共通だが、動物の進化に伴い、形態や発現分子種に様々な修飾が加わる。このような修飾は、足細胞を大きな力学的負荷に適応させ、濾過量の増大を可能にするうえで重要な変化（高度化）である。ところが、過去の研究では足細胞の類似性ばかりが目され、高度化に関してはそのほとんどが見過ごされてきた。このような状況の中、申請者らは、アクチン細胞骨格の高度化を脊椎動物の足細胞において初めて明らかにしてきた (Ichimura et al. 2003; Ichimura et al. 2007)。

## 2. 研究の目的

本研究では足細胞が作る濾過バリア構造（スリット膜）の進化・高度化の過程を構成分子種ならびに超微形態の観点から明らかにする。

## 3. 研究の方法

哺乳類における代表的なスリット膜構成分子のホモログの有無を全ゲノム塩基配列が分かっているいくつかの動物群において調査し、スリット膜構成分子の分子進化を明らかにする。次いで、この情報にもとづき、各動物種において、RT-PCR 法、in situ ハイブリダイゼーション法、免疫組織化学法により各スリット膜構成分子の足細胞における発現の有無をできる限り調査し、各動物種におけるスリット膜構成分子のセットを明らかにする。

## 4. 研究成果

### 1) 多細胞動物におけるスリット膜の構造の多様性：

多細胞動物間において、スリット膜構造を低分子量タンニン酸染色法により作製した透過電顕標本により検討し、動物群間で種々の構造多様性が認められることを明らかにした。哺乳類（齧歯類）の正常な成熟足細胞では、スリット膜は足突起の間を架橋する1枚の膜として認められるが、数種の動物（ヤツメウナギ、アメリカザリガニ）ではスリット膜が多層化している箇所が頻りに認められた。このようなスリット膜の多層化は、ネフローゼ症候群モデルであるラットの PAN 腎症において頻りに認められることが既に知られている。ネフローゼ症候群の際には、ある種のスリット膜構成分子の発現が低下するので、スリット膜において特定の分子が減少した場合に多層化が生じることが示唆されており、ヤツメウナギやアメリカザリガ

ニでは哺乳類が有しているスリット膜構成要素のセットのうち特定の要素が減少・欠損している可能性が考えられる。

### 2) 硬骨魚類におけるスリット膜構成分子：

哺乳類におけるスリット膜の主要構成分子であるネフリンの局在をメダカおよびゼブラフィッシュの前腎系球体において精査したところ、哺乳類と同様に、スリット膜が形成される以前に足細胞の腔側膜に局在が認められた。メダカでは足細胞の形成過程において、微絨毛様の突起が多数出現し、これらの先端どうしにスリット膜構造が認められるという特異な形態がみられた。このような構造は、ヌタウナギでは報告されているものの哺乳類では見ることができず、原始的な脊椎動物における足細胞形成の特徴と言える。

さらに、タイト結合構成分子の一種である Mpp5a がゼブラフィッシュの前腎系球体足細胞のスリット膜部に局在することも明らかとなった。なお、哺乳類において Mpp5 がスリット膜部に局在するかどうかは分かっておらず、その点に関して現在解析を進めている。

### 3) プラナリア（扁形動物）におけるネフリンホモログの局在：

原始的な無脊椎動物であるプラナリア（ナミウズムシ *Dugesia japonica*）の炎細胞（足細胞関連細胞）におけるスリット膜構成分子の探索を行なった。炎細胞の形態は脊椎動物の足細胞からは大きくかけ離れるものの、濾過部にスリット膜様構造を形成し、これが濾過バリアを成していると推測されている。そこで、プラナリアにおいて脊椎動物においてスリット膜の必須構成要素である Nephrin（実際にはそのオルソログ）が利用されているかを検討した。リュウキュウナミウズムシの EST データベース（慶応大学 松本緑教授作製）に存在した *nephrin* オルソログの発現を in situ ハイブリダイゼーション法により検討したところ、炎細胞の分布と類似した発現パターンが得られた。しかし、この標本をさらに抗アセチル化チュープリン抗体でラベルし炎細胞の位置と *nephrin* の発現部位を比較したところ、*nephrin* は炎細胞以外の細胞に発現することが判明した。したがって、炎細胞という原始的な段階では、*nephrin* がスリット膜形成には用いられず、その他の用途に利用されており、多細胞動物の進化過程のどこかでスリット膜の構成要素として転用されることが明らかとなった。なお、プラナリアにおける *nephrin* 発現細胞の同定は現在進行中である。

### 4) トビムシ類の飼育系の確立：

一般に昆虫類には足細胞は存在しないが、原始的な昆虫類であるトビムシ類では、頭部の体腔嚢を足細胞化させ、原尿産生を行なっている。本研究の副産物として、アヤトビムシの一種およびムラサキトビムシの実験室内での維持することに成功した。今後、これらを用い、昆虫類の足細胞解析に利用する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1) **Ichimura K**, Fukuyo Y, Nakamura T, Powell R, Sakai T, Obara T. Podocalyxin regulates pronephric glomerular development in zebrafish. *Physiol Rep* **1**(3):e00074 (2013) 査読有

2) **Ichimura K**, Fukuyo Y, Nakamura T, Powell R, Sakai T, Janknecht R, Obara T. Developmental localization of Nephricin in zebrafish and medaka pronephric glomerulus. *J Histochem Cytochem* **61**(4):313-24 (2013) 査読有

3) **Ichimura K**, Kawashima Y, Nakamura T, Powell R, Hidoh Y, Terai S, Sakaida I, Kodera Y, Tsuji T, Ma JX, Sakai T, Matsumoto H, Obara T. Medaka fish, *Oryzias latipes*, as a model for human obesity-related glomerulopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **431**(4):712-7 (2013) 査読有

4) **Ichimura K**, Bubenshchikova E, Powell R, Fukuyo Y, Nakamura T, Tran U, Oda S, Tanaka M, Wessely O, Kurihara H, Sakai T, Obara T. A comparative analysis of glomerulus development in the pronephros of medaka and zebrafish. *PLoS One* **7**(9):e45286 (2012) 査読有

5) **Ichimura K**, Fukuyo Y, Nakamura T, Powell R, Sakai T, Obara T. Structural disorganization of pronephric glomerulus in zebrafish *mpp5a/nagie oko* mutant. *Dev Dyn* **241**(12):1922-32 (2012) 査読有

6) Uchida K, **Ichimura K**. Elongation of in vitro cultured ovarian follicles in the mosquito, *Culex pipiens pallens*. *J Insect Physiol* **59**(1):38-45 (2013) 査読有

7) Bubenshchikova E, **Ichimura K**, Fukuyo Y, Powell R, Hsu C, Morrical SO, Sedor JR, Sakai T, Obara T. Wtip and Vangl2 are required for mitotic spindle orientation and cloaca morphogenesis. *Biol Open* **1**:588-596 (2012) 査読有

〔学会発表〕(計8件)

1) 市村 浩一郎 .哺乳類における腎系球体の進化と老化 .第14回腎セミナー(招待講演) 2013年08月08日(大津市)

2) 市村 浩一郎 .多細胞動物における原尿産生装置の進化 .第7回蠕虫研究会(招待講演) 2013年11月15日(藤沢市)

3) 市村 浩一郎 .多細胞動物における原尿産生装置の進化 .第55回信州腎セミナー(招待講演) 2014年03月08日(松本市)

4) 市村 浩一郎 .多細胞動物における原尿産生装置の進化 .第105回東京腎生理集談会(招待講演). 2014年05月24日(東京)

5) 市村 浩一郎、坂井 建雄 .糸球体疾患における濾過障壁の構造変化 .第118回日本解剖学会学術総会(シンポジウム) 2013年3月28日(高松市)

6) 市村 浩一郎、福与 弥生、中村 友美、レベッカ パウエル、坂井 建雄、小原 朋子 .ゼブラフィッシュ *mpp5a/nagie oko* 変異体における前腎系球体の形成異常 .第118回日本解剖学会学術総会 2013年3月28日(高松市)

7) **Ichimura K**, Bubenshchikova E, Powell R, Fukuyo Y, Nakamura T, Tran U, Oda S, Tanaka M, Wessely O, Kurihara H, Sakai T, Obara T . Pronephric glomerulus development in zebrafish and medaka. 10th International Conference Zebrafish Development and Genetics 2012年06月20日(Madison, Wisconsin, USA)

8) **Ichimura K**, Bubenshchikova E, Powell R, Fukuyo Y, Nakamura T, Tran U, Oda S, Tanaka M, Wessely O, Kurihara H, Sakai T, Obara T. Using both medaka and zebrafish to study glomerulus development and slit diaphragms. 9th International Podocyte Conference 2012年04月22日(Miami, Florida, USA)

〔図書〕(計1件)

1) 市村 浩一郎、寺山 隼人(著) 磯村 源藏、織田 銑一、東家 一雄、宮木 孝昌(監修)スンスの生物学(第1版)腎臓、尿管、膀胱の構造 .学会出版センター(2011年、東京)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

市村浩一郎(Koichiro Ichimura)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 1 0 3 4 3 4 8 5

(2)研究分担者

栗原秀剛 (Hidetake Kurihara)

順天堂大学・医学部・前任准教授

研究者番号：8 0 3 1 1 9 7 6

(3)連携研究者

なし