

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860693

研究課題名(和文)腎系球体濾過バリア形成におけるERMタンパク質の役割の解明

研究課題名(英文)Physiological functions of ERM proteins in the glomerular foot process formation

研究代表者

波多野 亮 (Hatano, Ryo)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：60521713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、アクチン結合タンパク質であるERM(ezrin, radixin, moesin)タンパク質が腎系球体足細胞の機能制御において果たす役割について検討を行った。ERMタンパク質のうちezrinは足細胞に豊富に発現しており、これまでの様々な報告からezrinの欠損は足突起の形態異常を引き起こす事が想定されていたが、ezrin欠損マウスを用いたin vivoでの解析では明らかな系球体の形態異常は見られなかった。一方で、ezrinを欠損する事で薬剤性の系球体傷害に対する抵抗性が見られる事が判明しており、ezrinの発現や機能の抑制が系球体傷害の軽減に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ezrin is the most abundantly expressed ERM (ezrin, radixin, moesin) protein in the glomerular podocytes, and is also reported to form multi-protein complex with several membrane proteins and other scaffold proteins whereas the physiological roles still remain unclear. In this study, we investigated the physiological importance of ezrin in the regulation of glomerular podocyte function by using ezrin knockdown mice. Ezrin deficient mice did not exhibit apparent glomerular dysfunction. However, loss of ezrin protected podocytes from drug-induced morphological changes in ezrin knockdown mice. Our results suggest that ezrin is involved in the regulation of cell motility in the glomerular podocytes.

研究分野：腎臓生理学

キーワード：系球体足細胞 ERMタンパク質 Rhoシグナル

### 1. 研究開始当初の背景

糸球体は血中に含まれる老廃物や異物を尿中に排泄するための濾過装置として重要な役割を果たしており、その機能異常は重篤な腎不全の発症にも繋がる。糸球体上皮細胞足細胞は糸球体内の毛細血管の周囲を包み込み、足突起を張り巡らせる事で濾過障壁を形成している。足突起の形態形成には様々な細胞骨格系タンパク質の関与が報告されており、その一つである ERM(ezrin, radixin, moesin)タンパク質のエズリンに関しても重要な役割を果たしている事が想定されていた。エズリンはシアル酸タンパク質であるポドカリキシンと分子複合体を形成することが報告されており、ポドカリキシン欠損マウスに見られるような足突起の消失が見られる可能性も考えられていたが、遺伝子改変動物を用いた研究報告もなくこれまでに *in vivo* でのエズリンの役割に関しては十分に検討が行われていなかった。

### 2. 研究の目的

エズリンノックダウン(*Vil2<sup>kd/kd</sup>*)マウスを用いて腎糸球体足細胞の足突起形成に関わるエズリンの *in vivo* での機能的役割について明らかにするとともに、糸球体傷害などの発生との関わりについて検討を行うことでエズリンの生理的、病理的な役割を解明する事を目的として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

本研究では、*Vil2<sup>kd/kd</sup>* マウスを用いて腎糸球体濾過機能について、尿中タンパク質排泄や組織化学解析、電子顕微鏡による糸球体足突起の微細構造解析を行った。また、足細胞においてエズリンと相互作用する可能性のある様々な膜輸送体タンパク質の局在について免疫蛍光染色により解析を行うとともに、磁性ビーズを用いて糸球体を単離し、各膜輸送体タンパク質の発現量の解析を実施した。基礎状態だけでなく薬剤により糸球体傷害を誘発し、その影響について同様の手法を用いて検討を行った。また、近年糸球体足細胞における突起形成の制御に重要な役割を担う事が報告されている低分子量 GTPase Rho の活性についても単離糸球体を用いて検討した。

### 4. 研究成果

当初の予想に反して、*Vil2<sup>kd/kd</sup>* マウスではポドカリキシン欠損マウスのような重篤な表現型は見られず、尿中へのタンパク質の漏出や糸球体の形態異常は認められなかった。透過型電子顕微鏡による足突起の微細構造解析においても野生型マウスに比べて、足突起の癒合などは認められず、正常な足突起構造をとっている事が確認された。

足細胞においてエズリンと相互作用することが報告されているいくつかのタンパク質について、免疫蛍光染色による局在解析を

行ったが明確な違いは野生型-*Vil2<sup>kd/kd</sup>* マウス間では見られず、単離糸球体を用いた総タンパク質量にも変化はほとんど見られなかった。このことからエズリンは必ずしも足突起の形成に必要なものではない事が示唆された。

そこで糸球体傷害時におけるエズリンの有無による影響を調べることとし、ドキシソルピシンにより糸球体傷害を誘発して尿タンパク質排泄や足突起の形態形成に及ぼす影響について検討を行った。野生型では投与1週間後に尿中へのタンパク質排泄量の増加や足突起の癒合が生じていたが、*Vil2<sup>kd/kd</sup>* マウスではその変化は軽度であり、野生型マウスに比べて薬剤誘発性の糸球体傷害に抵抗性を示す事が観察された。

エズリンは前述のように様々な膜タンパク質と分子複合体を形成する事が知られている他に低分子量 GTPase Rho の活性調節にも関わる事が報告されている。エズリンは Rho-GDI (GDP dissociation inhibitor) と相互作用し Rho シグナルの活性を調節する事が報告されている。一方、Rho-GDI の欠損は重篤な糸球体傷害を引き起こす事も知られている。エズリンの欠損は糸球体における Rho 活性の変化を引き起こし、糸球体傷害時の足突起のアクチン細胞骨格のリモデリングに伴う形態変化の調節に寄与していることが示唆される結果が得られている。

以上のように、エズリンは正常な足突起の形成に必須のものでなく、様々な刺激に伴う足突起の形態変化の調節に必要な可能性が考えられる。Angiotensin II などによりエズリンの活性化が引き起こされることも報告されており、エズリンは様々な病的刺激に対して足細胞の形態を変化させるとともに運動性を維持し、足細胞が受けるストレスを軽減させる上で重要な役割を果たしている可能性も考えられる。エズリンの活性を制御する事で足細胞の形態を調節する事が可能である可能性もあり、今後詳細に検討を進めて行く。

### 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 8 件)

- 1) Yoshida S, Fukutomi T, Kimura T, Sakurai H, Hatano R, Yamamoto H, Mukai K, Hattori T, Sugihara H, Asano S.  
Comprehensive proteome analysis of brush border membrane fraction of ileum of ezrin knockdown mice.  
*Biomed Res.* 37(2): 127-139, 2016.  
(査読あり) doi: 10.2220/biomedres.37.127.
- 2) Yoshida S, Yamamoto H, Tetsui T, Kobayakawa Y, Hatano R, Mukai K, Hattori T, Sugihara H, Asano S.  
Effects of ezrin knockdown on the structure

- of gastric glandular epithelia.  
*J Physiol Sci.* 66(1): 53-65, 2016.  
(査読あり)  
doi: 10.1007/s12576-015-0393-4.
- 3) Hatano R, Akiyama K, Tamura A, Hosogi S, Marunaka Y, Caplan MJ, Ueno Y, Tsukita S, Asano S.  
Knockdown of ezrin causes intrahepatic cholestasis by the dysregulation of bile fluidity in the bile duct epithelium in mice.  
*Hepatology.* 61(5): 1660-1671, 2015.  
doi: 10.1002/hep.27565.  
(査読あり)
- 4) Hatano R.  
The transporter-mediated regulation of prostaglandin signaling.  
*Membrane* 39(5); 329-336, 2014.  
(査読なし)
- 5) Matsumoto Y, Inden M, Tamura A, Hatano R, Tsukita S, Asano S.  
Ezrin mediates neuritogenesis via down-regulation of RhoA activity in cultured cortical neurons.  
*PLoS One.* 9(8): e105435, 2014.  
(査読あり)  
doi: 10.1371/journal.pone.0105435.
- 6) Hatano R, Mukouchi H, Matsumoto Y, Kawaguchi K, Kazama I, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Kurosawa S, Kanai Y, Matsubara M, Asano S.  
Glucocorticoid mediates the transcription of OAT-PG, a kidney-specific prostaglandin transporter.  
*Pflugers Arch.* 466(5): 925-935, 2014.  
(査読あり)  
doi: 10.1007/s00424-013-1351-8.
- 7) Hatano R, Asano S.  
Recent Advances in Understanding the Physiological Roles of ERM proteins.  
*Membrane* 38(4); 186-192, 2013.  
(査読なし)
- 8) Kazama I, Matsubara M, Kanai Y, Hatano R, Asano S, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Kurosawa S, Maruyama Y.  
Decreased expression of a novel prostaglandin transporter, OAT-PG, facilitates renocortical PGE<sub>2</sub> accumulation during rat pregnancy.  
*Gynecol Obstet Invest.* 76(3): 163-170, 2013.  
(査読あり) doi: 10.1159/000353977.
- [学会発表](計 20 件)
- 1) Hatano R, Kawaguchi K, Abe Y, Takeda A, Asano S.  
Physiological roles of ezrin in the formation of glomerular podocyte foot process.  
第 93 回日本生理学会大会.  
2016/03/23  
札幌コンベンションセンター(北海道)
- 2) 波多野亮, 浅野真司.  
足場タンパク質エズリンの上皮膜輸送機能制御における生理的役割  
第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会  
2015/10/17  
大阪大谷大学 (大阪府)
- 3) 波多野亮, 阿部有希子, 川口高德, 浅野真司  
腎系球体足細胞における細胞骨格系タンパク質 ezrin の役割についての検討  
第 10 回トランスポーター研究会年会  
2015/6/20  
慶応義塾大学 (東京都)
- 4) 波多野亮  
上皮膜輸送機能制御における細胞骨格系アダプター蛋白質エズリンの役割  
第 62 回日本生化学会近畿支部例会  
2015/5/16  
立命館大学 (滋賀県)
- 5) 波多野亮, 阿部有希子, 川口高德, 浅野真司  
腎系球体足細胞における細胞骨格系タンパク質 ezrin の役割の解析  
日本膜学会第 37 年会  
2015/5/14  
早稲田大学 (東京都)
- 6) 波多野亮, 秋山香織, 田村淳, 細木誠之, 丸中良典, Michael Caplan, 上野義之, 月田早智子, 浅野真司  
ezrin は胆管細胞における膜輸送体の局在制御を担う  
日本薬学会第 135 年会  
2015/3/28  
神戸学院大学、兵庫医療大学 (兵庫県)
- 7) Hatano R  
Molecular mechanism for morphological and functional regulation by scaffold proteins in the bile duct epithelium  
The 120th Annual meeting of the Japanese Association of Anatomists and  
The 92nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan  
2015/3/22  
神戸国際会議場 (兵庫県)
- 8) Hatano R, Kawaguchi K, Asano S.  
Moesin, a cytoskeletal-associated protein plays an important role in the regulation of membrane localization of NKCC2.  
American Society of Nephrology annual meeting. Kidney Week 2014  
2014/11/15  
フィラデルフィア (USA)
- 9) Hatano R, Akiyama K, Asano S.  
Ezrin, a membrane cytoskeletal cross-linker is essential for the regulation of biliary flow in mice.  
AASLD The Liver Meeting 2014  
2014/11/8  
ボストン (USA)

- 10) Hatano R, Asano S.  
 Novel physiological functions of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in the epithelial tissues  
 International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2014  
 2014/11/2  
 立命館大学 (滋賀県)
- 11) 波多野亮, 秋山香織, 田村淳, 細木誠之, 丸中良典, Michael Caplan, 上野義之, 月田早智子, 浅野真司  
 胆管細胞におけるイオン輸送体の膜発現及び機能制御における ezrin の役割  
 第 87 回日本生化学会大会  
 2014/10/16  
 京都国際会議場 (京都府)
- 12) 波多野亮, 秋山香織, 田村淳, 細木誠之, 丸中良典, 上野義之, 月田早智子, 浅野真司  
 肝内胆管による胆汁流動性制御における ezrin の新たな役割  
 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会  
 2014/10/11  
 京都薬科大学 (京都府)
- 13) Hatano R, Akiyama K, Asano S.  
 The physiological roles of ezrin in the regulation of bile fluidity  
 Physiology 2014  
 2014/6/30  
 ロンドン(UK)
- 14) 波多野亮  
 膜輸送体による腎局所プロスタグランジンシグナル制御機構に関する研究  
 日本膜学会第 36 年会  
 2014/5/13  
 早稲田大学 (東京都)
- 15) 波多野亮, 秋山香織, 田村淳, 細木誠之, 丸中良典, 月田早智子, 浅野真司  
 肝内胆汁うっ滞症における ezrin の役割についての検討  
 日本膜学会第 36 年会  
 2014/5/13  
 早稲田大学 (東京都)
- 16) 波多野亮, 秋山香織, 田村淳, 細木誠之, 丸中良典, 月田早智子, 浅野真司  
 肝内胆管機能調節における ezrin の役割について  
 日本薬学会第 134 年会  
 2014/3/30  
 熊本大学 (熊本県)
- 17) Hatano R, Kawaguchi K, Asano S.  
 Physiological Roles of Moesin, a Crosslinker between Membrane Proteins and Actin Cytoskeleton in the Electrolytes and Water Reabsorption  
 American Society of Nephrology Annual Meeting Kidney week 2013  
 2013/11/7  
 アトランタ (USA)
- 18) Hatano R, Akiyama K, Tamura A, Hosogi S,  
 Maruyama Y, Tsukita S, Asano S  
 Physiological Roles of Ezrin in the Regulation of Chloride Secretion by Cholangiocytes  
 International Union of Physiological Society 2013  
 2013/7/24  
 バーミンガム (UK)
- 19) 波多野亮, 浅野真司  
 生体内の上皮輸送及びバリア機能制御に関わるエズリンの新たな役割について  
 日本膜学会 35 年会  
 2013/5/21  
 早稲田大学 (東京都)
- 20) 波多野亮, 秋山香織, 田村淳, 細木誠之, 丸中良典, 月田早智子, 浅野真司  
 胆管細胞における ezrin の役割と肝内胆汁鬱滞症との関連性の検討  
 第 60 回日本生化学会近畿支部例会  
 2013/5/18  
 大阪大学 (大阪府)
- [ 図書 ] (計 1 件)  
 1) 浅野真司, 波多野亮  
 細胞骨格とリン調節  
 Annual Review 腎臓 2014, 294(p8-13)  
 中外医学社
- [ その他 ]  
 ホームページ等
- <http://research-db.ritsumei.ac.jp/Profiles/95/0009478/profile.html>
- <http://www.ritsumei.ac.jp/pharmacy/asano/index.html>
- 6 . 研究組織  
 (1)研究代表者
- 波多野 亮 ( HATANO, Ryo )  
 立命館大学・薬学部・助教  
 研究者番号 : 60521713
- (3)連携研究者
- 浅野 真司 ( ASANO, Shinji )  
 立命館大学・薬学部・教授  
 研究者番号 : 90167891