

平成 2 8 年 6 月 2 0 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860882

研究課題名(和文)ポドサイトの分化と機能維持を制御する新規エピジェネティック分子NSD3の役割

研究課題名(英文)Epigenetic role of NSD3 in podocyte maturation and function

研究代表者

倉山 亮太(Kurayama, Ryota)

杏林大学・医学部・その他

研究者番号：90529223

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)：ネフリンの遺伝子発現の制御機構の詳細は不明である。本研究は、エピジェネティック的遺伝子制御作用が知られているNSD3-Lのネフリン発現に関わる機序の存在を証明した。NSD3-L遺伝子とその産物は、糸球体ポドサイトに発現していた。NSD3-Lは、ヒストンH3K4に結合した。また、NSD3-Lはネフリンのプロモーターと結合し、その遺伝子発現を抑制した。NSD3-Lの遺伝子破壊は、ネフリンの発現を増加させた。NSD3-Lの存在は、H3K4me3のネフリンへの結合を低下させた。以上のことから、NSD3-Lは、ネフリン遺伝子の発現のエピジェネティック的抑制因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to determine the functional role of NSD3 long form (NSD3-L) in nephrin gene regulation. NSD3-L was found to bind nephrin promoter but not other podocyte specific promoters including CD2AP, leading to its inhibition/suppression, abrogating the stimulatory effect of WT1 and NF- κ B. Gene knockdown of NSD3-L in primary cultured podocytes accelerated the transcription of nephrin but not CD2AP. An in vivo zebrafish study involving the injection of NSD3-L mRNA into embryos demonstrated an apparent reduction of nephrin mRNA but not podocin and CD2AP mRNA. Finally, chromatin immunoprecipitation assay revealed the reduction of the association of trimethylated H3K4 at the nephrin promoter regions. In conclusion, our results demonstrate that NSD3-L acts as a histone methyltransferase in podocytes and regulates nephrin gene expression, which may in turn contribute to the integrity of the slit diaphragm of the glomerular filtration barrier.

研究分野：腎臓病学

キーワード：ネフリン 遺伝子発現 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

糸球体は腎における限外濾過装置であり、その機能破綻は腎不全や大量の血漿タンパクの尿中への喪失と、引き続く難治性の浮腫を惹起する。最近の分子生物学および細胞生物学的研究から、タンパク尿出現の原因には、糸球体上皮細胞（ポドサイト）の機能障害が根本的に関わることが判明している（Greka A, et al. *Annu Rev Physiol* 74:299-323, 2012）。ポドサイトの細胞特性は、発生期の糸球体においてさえも既に分裂能を失っている高度に分化した上皮細胞として規定される。ポドサイトは、ボウマン腔（尿腔）側で糸球体基底膜に接着しつつ、特徴的な足突起により、発生過程と成熟後の糸球体を覆っている。糸球体機能へのポドサイトの役割の最たるものは、この足突起間にスリット膜を形成し、尿中への血漿タンパクの漏れを防止することである。実際に、スリット膜の形成異常や障害は、先天的と後天的を問わず大量タンパク尿すなわちネフローゼの主たる原因になる（Tryggvason K, et al. *N Engl J Med* 354:1387, 2006）。

スリット膜は多くの膜貫通タンパクで構成され、その主たる構成分子はネフリンである。現在、このネフリンなどのスリット膜構成分子の遺伝子発現を制御している分子機構は、全く知られていない。遺伝子の制御機構には、プロモーター機能を調節する転写因子の役割が重要であるが、最近さらに DNA のメチル化やヒストン修飾により転写能をさらに上流から調節する機構：エピジェネティックスの重要性が注目されている。かかる状況下で、Karolinska 研究所の Tryggvason らは、大量のマウス糸球体を単離し、200 以上の新規腎糸球体特異的遺伝子群のリストを公開した（Takemoto M, et al. *EMBO J* 25:1160, 2006）。このリストの中で、代表研究者らは、唯一エピジェネティックスに関連することが示唆されている分子として、NSD3 (Nuclear SET domain-containing protein 3) に注目した。

2. 研究の目的

我々は、先行研究において、NSD3 は、1) 腎尿細管には short form のみ、糸球体には long form (NSD3-L) と short form が存在する、2) ポドサイトの核に特異的に局在し、同細胞の分化に伴ってそのタンパクと mRNA の発現が亢進することを同定した。本研究では、糸球体ポドサイトの機能発現に関わる NSD3 のエピジェネティック的関与の詳細をさらに検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト NSD3-L を human embryonic kidney cell (HEK) に強制発現させた株化

細胞 (HEK-NSD3-L) を作成した。また、磁気ビーズを C57BL マウスに環流させ、マグネットで糸球体を単離後、10cm dish で 7 日間培養し、ポドサイトの primary culture を行った。

(2) クロマチン免疫沈降

上記細胞株と primary culture ポドサイトを回収し、ホルマリンで処理後 DNA とヒストンを架橋させ、超音波処理にてクロマチン分画を得た。この分画をプロテイン G セファロース存在下で攪拌し、各抗体 (NSD3、H3K4me3、H3K27me3、H3K36me3、FLAG) をさらに反応させて免疫沈降産物を得た。この沈降産物を材料に、ネフリン、ポドシン、CD2AP、WT-1 の各プロモーター部分、およびネフリンについては更にエキソン部分 (gene body) の定量 PCR を行った。

(3) レポーターアッセイ

野生型 HEK 細胞と HEK-NSD3-L 細胞にネフリンのプロモーターを上流に置いた dual luciferase reporter システムを樹立した。

(4) NSD3 ノックアウトマウス

C57BL マウスを改変動物系統として、NSD3 のエキソン 5 を標的とした loxP-neo-loxP システムを用いた全身 null ノックアウトマウスを作成した。

(5) NSD3-L 強制導入 zebrafish

NSD3-L の mRNA を受精卵に注入後 5 日目に、ネフリン、ポドシン、CD2AP の発現を定量 PCR で解析した。

(6) NSD3 ノックダウン primary culture ポドサイト

マウス primary culture ポドサイトに NSD3 に対する siRNA を導入し、回収した RNA を材料にネフリンと CD2AP について定量 PCR を行った。

(7) NSD3 の相互作用蛋白の同定

NSD3 コンストラクトを bait として、マウス腎および精巣ライブラリーを用いて、yeast-two-hybrid screen 法で NSD3 結合タンパクの探索を行った。

4. 研究成果

NSD3-L は H3K4me3 と結合する

(1) HEK-NSD3-L を材料としたクロマチン免疫沈降の結果から、NSD3-L は H3K4me27 と H3K4me36 とには結合せず、遺伝子発現の活動の場の指標である H3K4me3 と結合することが判明した。

(2) NSD3-L はネフリンのプロモーターに特異的に結合する

HEK-NSD3-L と primary culture ポドサイトのいずれをも材料とした。両材料において、クロマチン免疫沈降によりネフリンのプロモーターと NSD3-L との結合が同定された。一方、ネフリン gene body (エキソン部分)、ポドシン、CD2AP、WT-1 のプロモーター部分については、有意な NSD3-L との結

合は同定されなかった。

(3) NSD3-L はネフリンの転写活性を抑制する

HEK-NSD3-L 細胞 と HEK 細胞にそれぞれ dual luciferase reporter システムを導入した。その結果、HEK-NSD3-L 細胞におけるネフリンプロモーター活性は、HEK 細胞におけるそれと較べて有意に低下した。また、HEK-NSD3-L 細胞 と HEK 細胞にそれぞれ、ネフリンの転写を促進することが知られている WT-1 と NF- κ B を一過性導入し、HEK 細胞の発現する内因性ネフリンの遺伝子発現を検討した。その結果、NSD3-L の存在は、WT-1 と NF- κ B によるネフリン発現の増強効果を抑制した。さらに、primary culture ポドサイトに siRNA を用いた NSD3-L 遺伝子ノックダウンを行ったところ、内因性ネフリンの遺伝子発現は有意に抑制された。この in vitro における NSD3-L の効果を in vivo で確認するために、zebrafish システムを用いた強制的 NSD3-L 遺伝子導入を行った。その結果、NSD3-L の増加により zebrafish の糸球体のネフリンの遺伝子発現は抑制されたが、同じ糸球体特異的分子であるポドシンと CD2AP の抑制は観察されなかった。

一方、NSD3 ノックアウトマウスについては、確かに意図とした NSD3 のエキソン 5 部分の欠失は確認された。しかし、腎形態やタンパク尿などの明らかな表現系の変化は観察されなかった。

(4) NSD3-L は H3K4me3 のネフリンプロモーターへの結合を抑制する

各ヒストン H3 トリメチル化抗体 (H3K4me3、H3K27me3、H3K36me3) を用いたクロマチン免疫沈降を行った。その結果、NSD3-L の存在下では、H3K4me3 とネフリンプロモーターとの結合性は有意に低下した。一方、H3K27me3 と H3K36me3 による沈降産物では、NSD3-L の存在の有無によるネフリンプロモーターとの結合性の差は観察されなかった。

(5) NSD3 結合蛋白の同定

Yeast two-hybrid screen による NSD3 結合蛋白の同定を試みた。マウス NSD3 cDNA を酵母用ベクターに入れ替えベイトとし、マウス腎 cDNA ライブラリーあるいはマウス精巣ライブラリーをプレイとした LexA-based GFP two-hybrid system で NSD3 結合蛋白分子を網羅的に探索した。腎 cDNA ライブラリー中には、集中的な候補分子は同定されなかった。しかし、精巣 cDNA ライブラリー中には、STAT1 が 50 クローンの中の 20 クローンという高い頻度で同定された。

本研究により、糸球体ポドサイトにおいて、NSD3-L はネフリンの遺伝子発現を特異的に抑制することが判明した。NSD には NSD1、NSD2、NSD3 の 3 種の isoform が存在する。ヒストンは、DNA への巻き付きの強弱により遺伝子の転写をコントロールしている。

NSD family はヒストンをメチル化することにより、プロモーターでの転写活性を調節すると考えられている。これまで、NSD1 と NSD2 については、少ないながらも相互作用する遺伝子が同定され、癌の発生進展に関わることが知られている (Morishita M, di Luccio E. *Biochim Biophys Acta*. Dec 1816:158, 2011)。一方、NSD3 については、siRNA 導入細胞における cell cycle の亢進から、むしろ腫瘍抑制因子としての位置づけが提唱されたが (Zhou, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 398:565, 2010) その実際の直接的なエピジェネティック機能の発現対象分子を含む蛋白機能はこれまで同定されていなかった。NSD3 では、long form である NSD3-L のみが DNA メチル化ドメインを有している。我々の先行研究により、NSD3-L は糸球体ポドサイトの核に局在することが判明し、さらに、本研究により、NSD3-L は腎由来である HEK 細胞において、核内で H3K4me3 と結合することが証明された。従来の癌細胞における報告により、NSD3-L は H3K4me3 のみならず H3K4me36 と結合することが知られている。これは、NSD3-L のエピジェネティック的な遺伝子発現制御が生体内で幅広く行われている可能性を示唆するものである。いずれにしろ、糸球体ポドサイトにおいては、H3K4me3 が NSD3-L のメチル化の基質と考えられる。

本研究の腎臓学における最も意味のある結果は、NSD3-L が糸球体ポドサイトの有する濾過バリアの主役であるネフリンの遺伝子発現を抑制するという現象である。これは、ネフリンプロモーターを導入したレポーターアッセイ、primary culture ポドサイトを用いた遺伝子ノックダウン、zebrafish を用いた遺伝子ノックダウンの結果から、間違いのない事実と考える。癌細胞においては、ある標的遺伝子に対する NSD3-L の抑制効果の推測はそれほど困難ではないが、ネフリンのような正常に機能する必要がある分子の遺伝子発現を抑制する生物学的意味は何であろうか。ポドサイトの最大の生物学的特性は、胎児期の未熟糸球体からすでに細胞分裂が停止している、いわゆる究極の分化細胞ということである。我々の先行研究により、ネフリンは S-shaped body 期からすでに弱く発現するが、この時期のポドサイトには NSD3-L も同じように発現することが明らかになっている。このことは、NSD3-L はその後の capillary 期から成熟期のポドサイトでの過度のネフリンの発現を、S-shaped body 期からすでに調節しつつポドサイトの分化に貢献していることが推測される。しかし、我々が作成した完全ノックアウトマウスにおいて、ネフリンの発現の減弱はなかった。このことは、ポドサイトにおけるネフリンの遺伝子発現は、多くの代償機構を併せ持つ極めて精緻な機序により行なわれていることを示唆する。

一方、我々の先行研究により、NSD3-L は腎のみならず精巣を含む多くの臓器に発現が確認されている。精巣ライブラリーを用いた yeast two-hybrid screen により、NSD3-L の新たなリガンド候補として STAT1 が浮上した。STAT1 は、成長因子やサイトカインによるリン酸化の結果核内に移動し、多くの標的の遺伝子発現を促進する分子である。したがって、NSD3-L はこの STAT1 と結合することで、標的遺伝子の発現を抑制する可能性も考えられる。今後、精子細胞の分化過程における NSD3-L の機能の関与についても解析する必要がある。

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)

なし

〔雑誌論文〕(計 件)

なし

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 伊藤雄伍, 木内善太郎, 西堀由紀野, 楊國昌, 秋元義弘: ネフリン遺伝子の発現における Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 のエピジェネティックな役割, 第 48 回小児腎臓病学会 徳島 平成 25 年 6 月 28 日 ~ 29 日 .
- 2) Ito Y, Kiuchi Z, Nishibori Y, Yan K, Akimoto Y : Epigenetic role of Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 long form in nephrin gene expression. The 16th Congress of the International Pediatric Nephrology Association, Shanghai, Aug.30-Sep.3, 2013.

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉山亮太 (KURAYAMA RYOTA)

杏林大学・医学部・その他

研究者番号: 90529223

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: