

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670149

研究課題名(和文)腎肥大を規定する新規制御因子Slp2-aの機能解析

研究課題名(英文)The role of Slp2-a in the control of renal cell size

研究代表者

安田 貴雄 (YASUDA, Takao)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70598482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腎肥大を特徴とする嚢胞性腎疾患(PKDs)は、最終的に慢性腎不全へと移行する非常に頻度の高い遺伝子疾患であるが、未だ十分な治療方法は確立されていない。

報告者は、腎臓尿管上皮モデル細胞や嚢胞性腎疾患モデル動物を用いて、腎臓細胞の大きさや形態形成に関わる分子 synaptotagmin-like protein 2-a (Slp2-a) とその下流シグナル分子の関与を明らかにした。これまでの結果から、Slp2-aシグナルの活性調節により新たな嚢胞性腎疾患の治療に繋がるのではないかと期待している。

研究成果の概要(英文)：Polycystic kidney diseases (PKDs) are the most frequent genetic cause of end-stage renal disease that are characterized by renal cyst growth. Since there is still no treatment for PKDs, determining the molecular mechanisms of the pathogenesis of PKDs is crucial to the search for therapeutic targets. We found the critical involvement of synaptotagmin-like protein 2-a (Slp2-a) and its signaling in the control of renal cell size and morphogenesis by using Madin-Darby canine kidney II (MDCK II) cells and rodent models of human nephronophthisis. Modulation of the activity of Slp2-a signaling would be a novel effective treatment option for PKDs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Slp2-a ezrin 腎臓尿管上皮細胞 嚢胞性腎疾患 慢性腎不全

1. 研究開始当初の背景

腎臓に多数の嚢胞ができる嚢胞性腎疾患 (polycystic kidney disease: PKD) は、単一の遺伝性疾患では非常に頻度が高く、わが国においても 10 万人以上の患者がいるものと推定されている。出生前に嚢胞形成が始まり、両側の腎臓に多数の嚢胞ができる。さらに嚢胞を取りまく細胞の肥大や増殖・嚢胞内への液体の流入に伴い腎肥大を起し、徐々に腎機能が低下することで、最終的に腎不全へと至る (図 1)。このため嚢胞性腎疾患の治療は大きな課題になっているが、その根本的な治療方法は未だ確立されていない。

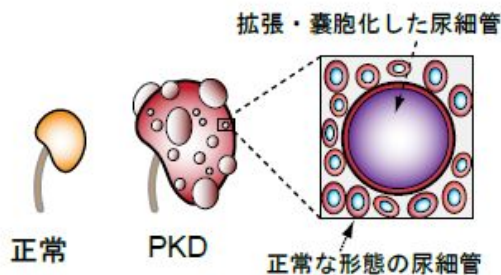


図 1 正常な腎臓と嚢胞性腎疾患の腎臓

2. 研究の目的

報告者は、これまで膜輸送の普遍的制御因子である低分子量 G 蛋白質 Rab27 のエフェクター分子 synaptotagmin-like protein 2-a (Slp2-a) が腎臓尿細管上皮モデル細胞 (MDCK II 細胞) の形態形成や極性形成に関わることを明らかにしている¹⁻⁴。すなわち、MDCK II 細胞において Slp2-a 発現を欠損させると、上皮細胞の頂端膜に局在するシグナル分子 (ポドカリキシン) をうまく頂端膜に繋ぎ止められず、極性形成シグナルに異常をきたし、細胞間バリアとして働く密着結合分子の発現が低下すること¹、複数の管腔が形成されること^{2,3}、さらに上皮細胞が肥大してしまうことを見出している (申請時、未発表データ)⁴。嚢胞性腎疾患モデルマウスにおいて、Slp2-a の発現異常や Slp2-a シグナル異常も認めており (申請時、未発表データ)⁴、Slp2-a シグナル異常と嚢胞性腎疾患発症との関連性が示唆されているが、その詳しいメカニズムは未だ明らかではない。本研究では、嚢胞形成に関わる新たなシグナル伝達機構に着目し、尿細管上皮細胞の大きさ制御の分子基盤とその破綻による嚢胞性腎疾患発症との関連性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、Slp2-a による細胞の大きさ制御の分子基盤を明らかにするため、単一

の MDCK II 細胞をモデル系に用い、その下流シグナル伝達機構を解明すると共に、嚢胞性腎疾患の病態発症との関連性に関しても以下の手法で検証した。

- (1) 細胞の大きさ制御に関わる Slp2-a の機能ドメインの同定
- (2) Slp2-a 機能ドメインへの新規結合分子の探索
- (3) Slp2-a 欠損 MDCK II 細胞における細胞の大きさ制御に関わるシグナル経路の解析、及び細胞の肥大化を抑える阻害剤の探索
- (4) 腎腫大を伴う嚢胞性腎疾患モデル動物における Slp2-a シグナルの解析

4. 研究成果

(1)(2) Slp2-a の機能ドメインとその結合分子の探索

Slp2-a は N 末端側に Slp family 内でよく保存された SHD (Slp-homology domain) ドメイン、中央に linker ドメイン、C 末端側に 2 つの C2 ドメイン (C2A ドメインと C2B ドメイン) を有する (図 2)。これまでに、Slp2-a は SHD ドメインを介して輸送小胞上の Rab27 と結合し、さらに C2A ドメインを介して細胞膜へと輸送小胞を繋ぎ止めることを明らかにしている¹⁻³が他のドメインの機能は未解明であった。今回、新たに腎臓尿細管上皮細胞の大きさ調節に関わる Slp2-a の機能ドメインを見出すことに成功した。Slp2-a は linker ドメインを介してタンパク質脱リン酸化酵素 (Protein Phosphatase 1 β) と結合すること、さらに C2B ドメインを介して Rap1GAP2 (Rap1 不活性化因子) と結合することで、それぞれ直接的、または間接的に細胞肥大に関わるシグナル分子 ezrin の活性を調節することを明らかにした^{4,5}。

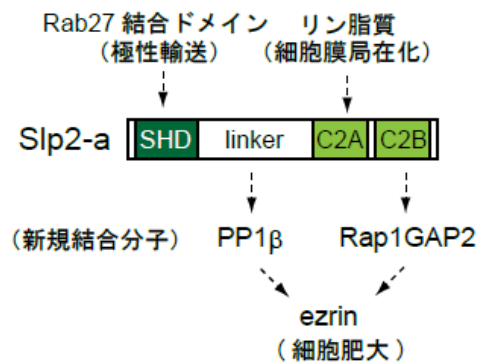


図 2 細胞肥大に関わる Slp2-a 機能ドメイン

(3) Slp2-a 欠損 MDCK II 細胞における細胞の大きさ制御に関わるシグナル経路の解析、及び細胞の肥大化を抑える阻害剤の探索

Slp2-a は C2B ドメインを介して、細胞の形態や接着に関わる Rap1 分子の不活性化因子 (Rap1GAP2) と結合し、Rap1GAP2 を細胞膜に

繋ぎ止める働きをしていることを明らかにした。細胞膜に繋ぎ止められた Rap1GAP2 は、下流の Rap1 シグナルの活性を抑制し、さらにその下流に位置する ezrin の活性を間接的に抑えていることを明らかにした⁴。一方で、Slp2-a の linker ドメインは ezrin のリン酸化（活性型）を直接抑えるタンパク質脱リン酸化酵素（PP1 β ）と結合し、細胞膜に繋ぎ止めることも同時に明らかにした⁵。Slp2-a は Rap1GAP2 や PP1 β を細胞膜に繋ぎ止めることで、細胞膜上の ezrin を不活性化し、細胞の大きさをコンパクトに保つ働きをしていることを明らかにした。

細胞の大きさ調節に関わる重要なシグナル分子である ezrin の活性を抑える薬剤を探索した結果、これまでに 2 種類の候補薬剤を見出すことに成功している。1 つ目は ezrin の直接的阻害剤である ezrin inhibitor (NSC668394)⁵ と、2 つ目は Slp2-a シグナルとは異なる経路で ezrin 活性を抑える薬剤（グルコシルセラミド合成酵素阻害剤）を見出した。すなわち、肥大した Slp2-a 欠損 MDCK II 細胞にそれらの薬剤を処置すると細胞肥大を解消することができた。

Slp2-a 欠損細胞を 3 次元培養すると複数の管腔が形成されることをこれまでに明らかにしていることから²、次に複数の管腔形成に Slp2-a-ezrin シグナルが関与するかを検証した⁶。その結果、野生型の正常細胞に ezrin 活性化剤（オカダ酸）を処置すると、複数の管腔が形成された（図 3 上：未発表データ）。一方、複数の管腔を形成する Slp2-a 欠損細胞に ezrin 阻害剤（NSC668394）を処置すると、野生型と同様に一つの管腔形成へと回復することが明らかとなった（図 3 下：未発表データ）。

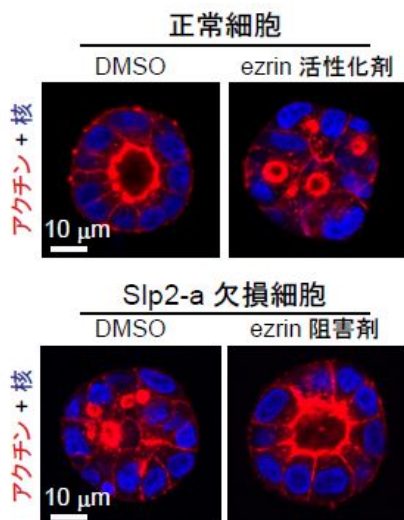


図 3 ezrin 活性調節による管腔形成への影響

(4) 腎腫大を伴う嚢胞性腎疾患モデル動物における Slp2-a シグナルの解析

これまでに報告者は、嚢胞性腎疾患モデル

マウス（*pcy* マウス）において、Slp2-a シグナルの異常（ezrin の顕著な活性化）と嚢胞を取りまく腎臓尿細管上皮細胞での ezrin の局在異常を見出している⁴。Slp2-a シグナルの異常が他の嚢胞性腎疾患モデル動物でも普遍的に存在しているかを検証するため、嚢胞性腎疾患モデルラット（*pck* ラット：図 4 左）を用いて Slp2-a シグナルの変化を調べた。その結果、*pck* ラットの腎臓でも同様に ezrin の顕著な活性化（図 4 右：未発表データ）と嚢胞を取りまく腎臓尿細管上皮細胞での局在異常を明らかにした（未発表データ）。

これらの結果から、Slp2-a シグナルの異常と嚢胞性腎疾患発症との関連性が強く示唆されることから、今後 Slp2-a シグナルを標的とした新たな嚢胞性腎疾患治療薬の開発に繋がることを期待している。

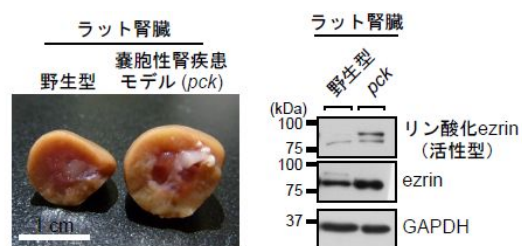


図 4 嚢胞性腎疾患モデルラットにおける ezrin 活性上昇

<引用文献>

Yasuda T., Saegusa C., Kamakura S., Sumimoto H. & Fukuda M. Rab27 effector Slp2-a transports the apical signaling molecule podocalyxin to the apical surface of MDCK II cells and regulates claudin-2 expression. *Molecular Biology of the Cell*, 23, 3229-3239, 2012

Gálvez-Santisteban M., Rodoriguez-Fraticelli A. E., Bryant D. M., Vergarajauregui S., Yasuda T., Bañón-Rodríguez I., Bernascone I., Datta A., Spivak N., Young K., Slim C. L., Brakeman P. R., Fukuda M., Mostov K. E. & Martín-Belmonte F. Synaptotagmin-like proteins control the formation of a single apical membrane domain in epithelial cells. *Nature Cell Biology*, 14, 838-849, 2012

安田貴雄、福田光則 Slp2-a によるシグナル伝達分子 podocalyxin の apical 輸送と細胞間相互作用への影響 *生化学雑誌(表紙に採用)*, 85, 106-110, 2013 年 2 月

Yasuda T. & Fukuda M. Slp2-a controls renal epithelial cell size through regulation of Rap-ezrin signaling independently of

Rab27. *Journal of Cell Science*, 127, 557-570, 2014

Yasuda T., Homma Y. & Fukuda M.
Slp2-a inactivates ezrin by recruiting protein phosphatase 1 to the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460, 896-902, 2015

Yasuda T., Mrozowska P. S. & Fukuda M.
Functional analysis of Rab27A and its effector Slp2-a in renal epithelial cells. *Methods in Molecular Biology*, 1298, 127-139, 2015

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 3 件)

Yasuda T., Homma Y. & Fukuda M.
Slp2-a inactivates ezrin by recruiting protein phosphatase 1 to the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 460, 896-902, 2015
DOI:10.1016/j.bbrc.2015.03.099

Yasuda T., Mrozowska P. S. & Fukuda M.
Functional analysis of Rab27A and its effector Slp2-a in renal epithelial cells. *Methods in Molecular Biology*, 査読有, 1298, 127-139, 2015
DOI:10.1007/978-1-4939-2569-8_11

Yasuda T. & Fukuda M.
Slp2-a controls renal epithelial cell size through regulation of Rap-ezrin signaling independently of Rab27. *Journal of Cell Science*, 査読有, 127, 557-570, 2014
DOI:10.1242/jcs.134056

6. 研究組織

(1)研究代表者

安田 貴雄 (YASUDA, Takao)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号：70598482