

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591017

研究課題名（和文）糸球体濾過バリアー機能維持に重要な分子間相互作用と情報伝達系における意義の解析

研究課題名（英文）Molecular interaction that is important for the maintenance of glomerular filtration barrier and its significance in the signal transduction system

研究代表者

涌井 秀樹 (WAKUI HIDEKI)

秋田大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70240463

研究成果の概要（和文）：腎の糸球体濾過バリアー機能が破綻すると、多量の蛋白尿を呈するネフローゼ症候群を発症する。本研究で、バリアー機能維持に重要な構成要素であるアクチニン 4 と相互作用する新規分子として、RACK1 を同定した。RACK1 は種々のシグナル伝達分子と相互作用することが知られており、アクチニン 4 と RACK1 との相互作用は、シグナル伝達系を介したバリアー機能維持に重要と考えられた。また、バリアー機能の破綻をきたした臨床例の観察で、新たな知見も報告した。

研究成果の概要（英文）：Dysfunction of the glomerular filtration barrier in the kidney causes nephrotic syndrome with massive proteinuria. In the present study, RACK1 was identified as a novel molecule that can interact with actinin 4, an important component for the maintenance of barrier function. Since RACK1 is known to be interact with various signal transduction molecules, the actinin 4 / RACK1 interaction is considered to be important for the maintenance of barrier function via the signal transduction system. In addition, novel findings in clinical cases with dysfunction of the glomerular filtration barrier were reported.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：(1) 細胞・組織、(2) シグナル伝達、(3) 生体分子、(4) 蛋白質、(5) 内科、(6) 糸球体濾過バリアー、(7) アクチニン 4、(8) 蛋白尿・ネフローゼ症候群

## 1. 研究開始当初の背景

腎の糸球体（特にポドサイト）には濾過バリアー機能があり、血中蛋白質の尿中漏出を防いでいる。近年、このバリアー機能維持に

重要な分子群が同定されたが、分子間相互作用による複雑なシグナル伝達系の存在が示唆されている。このバリアー機能が破綻すると、蛋白尿を呈する (Pattrakka J, Tryggvason K: New insights into the role of podocyte

in proteinuria. *Nat Rev Nephrol* 5: 463-468, 2009)。これら分子群の中で、アクチニン 4 は、特にアクチン細胞骨格の機能維持に重要な分子である (Faul C, et al.: Actin up: regulation of podocyte astructure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 17: 428-437, 2007)。

我々は、蛋白尿を惹起する動物モデル PAN 腎症で、PAN が糸球体濾過バリアー構成要素を標的とする可能性を考えている。実際に、PAN はアクチニン 4 のスペクトリン様繰り返しドメイン (以下、R1-4 ドメイン) との強い結合能を有することを示した (Goto H, et al.: Renal alpha-actinin-4: purification and puromycin aminonucleoside-binding property. *Nephron Exp Nephrol* 93: e27-e35, 2003)。アクチニン 4 のこのドメインと相互作用する分子として、シグナル伝達系での働きが示唆される humanin と OK/SW-CL. 16 を報告した (Kigawa A, et al.: Interaction of the spectrin-like repeats of alpha-actinin-4 with humanin peptide. *Clin Exp Nephrol* 8: 331-338, 2004; Togashi M, et al.: Interaction of alpha-actinin-4 with class I PxxP motif-containing OK/SW-CL. 16 protein. *Nephron Exp Nephrol* 107: e65-e72, 2007)。

## 2. 研究の目的

ヒト症例で、アクチニン 4 のアクチン結合ドメイン (以下、CH1-2 ドメイン) に先天性のアミノ酸置換があると、糸球体濾過バリアー機能の破綻が起こり、多量の蛋白尿と、進行性の腎不全を呈することが知られている (Kaplan JM, et al.: Mutations in *ACTN4*, encoding  $\alpha$ -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 24: 251-256, 2000)。

アクチニンの CH1-2 ドメインには、アクチンとの結合以外に相互作用する分子が存在し (例えば PIP2: Franzot G, et al.: The crystal structure of the actin binding domain from alpha-actinin in its closed conformation: structural insight into phospholipid regulation of alpha-actinin. *J Mol Biol* 22: 151-165, 2005)、アクチニン 4 CH1-2 ドメインのアミノ酸置換より、他分子との相互作用が消失し、その結果、バリアー機能の破綻を惹起する可能性を想定している。

本研究の目的は、アクチニン 4 の CH1-2 ドメインと相互作用する新規分子を同定することである。また、糸球体濾過バリアー機能が障害された臨床例での新しい知見も提示する。

## 3. 研究の方法

(1) アクチニン 4 CH1-2 ドメインと相互作用する新規分子の同定

### ①大腸菌 two-hybrid スクリーニング

アクチニン 4 CH1-2 ドメインとヒト腎 cDNA ライブラリーを用い、大腸菌 two-hybrid スクリーニングを行った。アクチニン 4 CH1-2 ドメインと相互作用する陽性クローンを得、この cDNA がコードする蛋白質 (以下、蛋白質 X) 同定した。

### ②In vitro 結合実験 (GST pull-down 法)

アクチニン 4 CH1-2 ドメインと蛋白質 X との結合を、in vitro 結合実験で確認した。GST、GST-アクチニン 4 CH1-2 ドメイン、GST-アクチニン 4 R1-4 ドメインを大腸菌に発現して精製し、グルタチオンビーズに結合させた。His タグ付き蛋白質 X を大腸菌に発現して精製し、上記のグルタチオンビーズとインキュベートし、ビーズを洗浄後に、結合した His タグ付き蛋白質 X を、Western blot で検討した。

### ③In vivo 結合実験 (免疫沈降法)

アクチニン 4 CH1-2 ドメインと蛋白質 X との結合を、in vivo 結合実験で確認した。培養ヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) を用い、HA タグ付きアクチニン 4 CH1-2 ドメインと、Myc タグ付き蛋白質 X 共発現させた。この細胞から抽出した蛋白質溶液を、抗 HA 抗体を結合させた protein A セファロースにインキュベートし、セファロースを洗浄後に、結合した蛋白質を抽出し、抗 HA 抗体と抗 Myc 抗体による Western blot を行った。

### ④免疫細胞染色

HEK293 細胞を用い、抗アクチニン 4 抗体と、①で同定した蛋白質 X に対する抗体による二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で共局在性を観察した。また、アンジオテンシン II を培養液に添加した際の局在変化も観察した。

(2) 糸球体濾過バリアー機能が障害された臨床例での新しい知見

糸球体濾過バリアー機能の破綻をきたした症例で、示唆に富む臨床病理学的情報を提示する。

#### 4. 研究成果

(1) アクチニン 4 CH1-2 ドメインと RACK1 との相互作用

##### ①大腸菌 two-hybrid スクリーニング

スクリーニングで得られた陽性クローンを図 1 に示す。

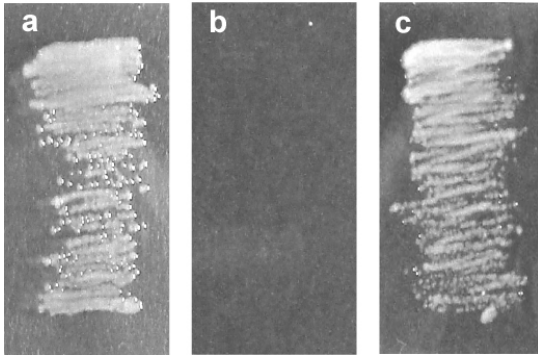


図 1. 大腸菌 two-hybrid スクリーニング

- a: 陽性コントロールコロニー
- b: 陰性コントロールコロニー
- c: スクリーニングで得られた陽性クローンのコロニー

このクローンから回収された cDNA は、種々のシグナル伝達分子や、細胞骨格関連分子と相互作用する RACK1 の全長をコードしていた (Adams DR, et al.: RACK1, a multifaceted scaffolding protein: structure and function. Cell Commun Signal 9: 22, 2011)。そのアミノ酸配列を図 2 に示す。

```

1 mteqmtlrgt lkghngwvtq iattpqfpdm
  ilsasrdkti imwkltrdet nygipqralr
61 ghshfvsdvv issdqgfals gswdgtlrlw
  dlrtgtttrr fvghtkdvls vafssdnrqi
121 vsgrsdktik lwntlgvcky tvqdeshsew
  vscvrfspns snpiivscgw dklvkvnla
181 ncklktnhig htgylntvtv spdgsllcasg
  gkdqgamlwd lnegkhlytl dggdiinalc
241 fspnrywlca atgpsikiwd legkiivdel
  kqevistssk aepqctsla wsadgqtlfa
301 gytdnlvrwv qvtigtr
  
```

図 2. 図 1 の陽性コロニーの cDNA がコードする RACK1 の全アミノ酸配列

##### ②In vitro 結合実験 (GST pull-down 法)

GST ビーズ、GST-アクチニン 4 CH1-2 ドメインビーズ、GST-アクチニン 4 R1-4 ドメインビーズと、His タグ付き RACK1 との結合性を、GST pull-down 法で確認した。この結果を図 3 に示す。

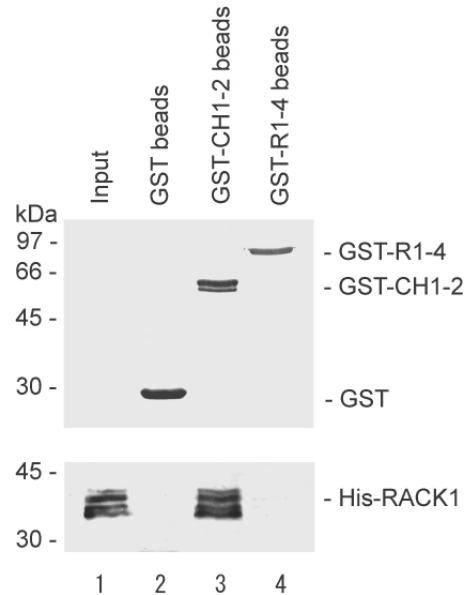


図 3. GST pull-down の結果 (3 種類のビーズに His-RACK1 を加えてインキュベートし、ビーズに結合した His-RACK1 を検出した)

- 1: インプット (His-RACK1)
- 2: GST ビーズからの抽出サンプル
- 3: GST-アクチニン 4 CH1-2 ドメイン (GST-CH1-2) ビーズからの抽出サンプル
- 4: GST-アクチニン 4 R1-4 ドメイン (GST-R1-4) ビーズからの抽出サンプル

上: SDS-PAGE (Coomassie blue 染色)  
各ビーズに結合させた GST、GST-CH1-2、GST-R1-4 を示す。

下: Western blot (抗 RACK1 抗体使用)  
インプットした His-RACK1 が GST-CH1-2 ビーズとのみ結合したことを示す。

##### ③In vivo 結合実験 (免疫沈降法)

HEK293 細胞に、HA タグ付きアクチニン 4 CH1-2 ドメイン (HA-CH1-2) と、Myc タグ付き RACK1 (Myc-RACK1) を共発現させた。コントロールとして、HEK293 細胞に、Myc-RACK1 のみを発現させた。これら細胞からの蛋白質抽出液を用いた免疫沈降実験の結果、共発現させた HA-CH1-2 と Myc-RACK1 は、細胞内での結合性を有すると考えられた。この結果を図 4 に示す。

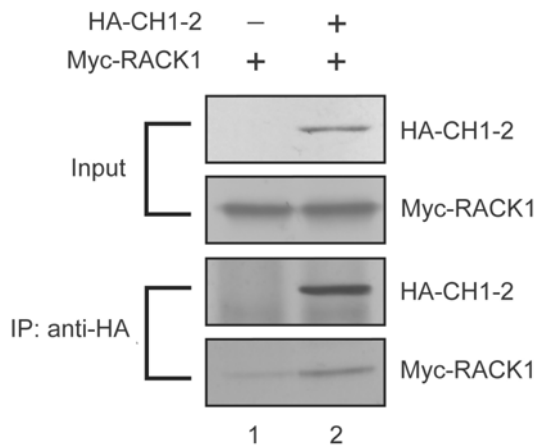


図 4. 免疫沈降実験結果

- 1: Myc-RACK1 のみ発現させた細胞からのサンプル
- 2: HA-CH1-2 と Myc-RACK1 を共発現させた細胞からのサンプル

各々の細胞から、蛋白質溶液を抽出し、抗 HA 抗体と抗 Myc 抗体による Western blot で、目的の蛋白質発現を確認した (Input)。これら蛋白質溶液を、抗 HA 抗体を結合させた protein A セファロースにインキュベートし、免疫沈降 (IP) を行った。セファロースを洗浄後、結合した蛋白質を抽出し、抗 HA 抗体と抗 Myc 抗体による Western blot を行った。2 の IP サンプルに、HA-CH1-2 と Myc-RACK1 のバンドを確認した。1 のコントロール IP サンプル中の Myc-RACK1 のバンドは、2 に比して微量 (セファロースへの非特異的結合による) であった。

#### ④免疫細胞染色

培養 HEK293 細胞を用い、抗アクチニン 4 と抗 RACK1 抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡でした。アクチニン 4 の染色性は主に細胞辺縁と一部は核に、RACK1 は主に細胞辺縁にみられ、細胞辺縁の一部にアクチニン 4 と RACK1 の共局在を認めた (図 5)。

アンジオテンシン II を培養 HEK293 細胞に添加すると、アクチニン 4 と RACK1 の染色性は細胞質主体となり、一部に共局在性を認めた。アクチニン 4 の核内周囲の染色性は増強し、RACK1 の一部も核内に移行したが、核内でのアクチニン 4 と RACK1 の共局在はわずかであった (図 6)。

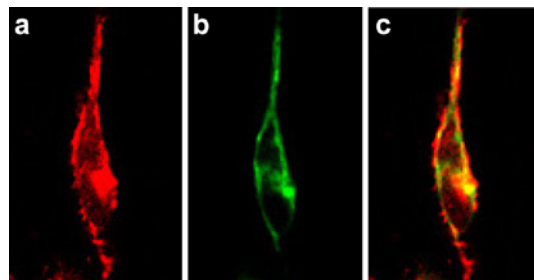


図 5. 共焦点レーザー顕微鏡所見

- a: ウサギ抗アクチニン 4 抗体、赤色色素標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた染色像。
- b: マウス抗 RACK1 抗体、緑色色素標識抗マウス IgG 抗体を用いた染色像。
- c: a と b の融合像。黄色の部分は、アクチニン 4 と RACK1 の共局在を示す。

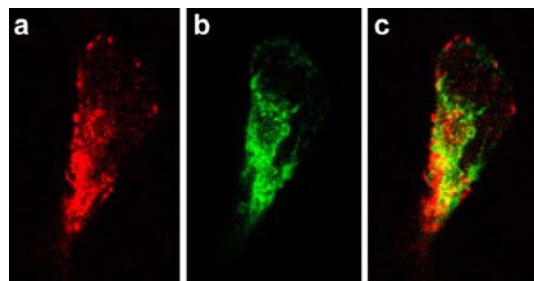


図 6. 共焦点レーザー顕微鏡所見

- a: ウサギ抗アクチニン 4 抗体、赤色色素標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた染色像。
- b: マウス抗 RACK1、緑色色素標識抗マウス IgG 抗体を用いた染色像。
- c: a と b の融合像。黄色の部分は、アクチニン 4 と RACK1 の共局在を示す。

#### (2) 微小変換型ネフローゼ症候群 (MCNS) 症例の末梢血 Th1/Th2 不均衡

MCNS 症例のネフローゼ期と寛解期の比較で、ネフローゼ期の末梢血単核球に、GATA-3 と IL-13 の mRNA の高発現を認めた。MCNS で想定されている糸球体濾過バリアー透過性亢進因子の産生に、Th2 サイトカインの優位性が示唆された (文献③)。

#### (3) テロイド依存性難治性 MCNS 症例での抗 CD20 抗体療法の有用性

ステロイド依存性難治性 MCNS 症例で、当院の倫理委員会の承認を得て抗 CD20 抗体療法 (リツキシマブ点滴静注) の有用性を観察した。従来から、MCNS の病因に T 細胞機能異常の重要性が指摘されていたが、難治性 MCNS 症例では B 細胞機能異常の重要性も示唆された (学会発表①)。

(4) これまでに報告のない糸球体病理像を呈した症例

蛋白尿と進行性腎機能障害をきたした症例で、糸球体濾過バリアーを中心に、電顕像で特異な横紋構造を呈する沈着物を認めた。この沈着物の由来について、種々の特異抗体を用いた免疫組織学的検討を行った。その結果、新たな病理病型と考えられ、臨床病理像の詳細を報告した（文献②）。

(5) 抗 RNP 抗体陽性患者における二次性膜性腎症の糸球体沈着性 IgG サブクラス

抗 RNP 抗体陽性患者における膜性腎症では、糸球体濾過バリアーに沈着する IgG サブクラスは IgG2 が優位であり、IgG3 が優位のループ膜性腎症や、IgG4 が優位の一次性膜性腎症とは全く異なることを報告した（学会発表②、文献①）。

(6) 本研究で得られた成果の考察

本研究で、アクチニン 4 CH1-2 ドメインと相互作用する新規分子として、RACK1 を同定した。アクチニン 4 は、糸球体濾過バリアーの重要な構成分子であり、同じく非筋型のアクチニン 1 と共に、種々の糸球体疾患での病因・病態に関与している (Oikonomou KG, et al.: Alpha-actinin: a multidisciplinary protein with important role in B-cell driven autoimmunity. *Autoimmun Rev* 10: 389-396, 2011)。

アクチニンと RACK1 は、それぞれが種々の細胞骨格関連分子や、シグナル伝達分子と相互作用することが知られている (Sjöblom B, et al.: Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65: 2688-2701, 2008; Sklan EH, et al.: RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 78: 117-134, 2006)。本研究で見出されたアクチニン 4 と RACK1 の相互作用は、糸球体濾過バリアーのポドサイトにおいて、アクチン細胞骨格とシグナル伝達分子との連結に関与するものと推定され、インパクトのある研究成果である。

アクチニン 4 は、アクチンと細胞外器質が連結する focal adhesion 部位の他に、細胞を刺激すると、本研究でも認めたように、核内にも発現する (Kumeta M, et al. Molecular mechanisms underlying nucleocytoplasmic shuttling of actinin-4. *J Cell Sci* 123: 1020-1030, 2010)。この点も含め、ポドサイトにおけるアクチニン 4 と RACK1 との相互作用の生理的意義の更なる解析が、今後の検討課題である。

糸球体濾過バリアー機能が障害された臨床例で、新たな知見をまとめた 3 論文は、国際腎専門誌に発表された。いずれも、臨床病理学的に意義深い報告である。

#### 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Omokawa A, Komatsuda A, Nara M, Fujiwara T, Sato R, Togashi M, Okuyama S, Sawada K, Wakui H: Distribution of glomerular IgG subclass deposits in patients with membranous nephropathy and anti-U1 ribonucleoprotein antibody. *Nephrol Dial Transplant* 27: 1937-1941, 2012. 査読有

② Ohtani H, Wakui H, Komatsuda A, Goto H, Tada M, Ozawa M, Kobayashi R, Sawada K: Progressive glomerulopathy with unusual deposits of striated structures: a new disease entity? *Nephrol Dial Transplant* 25: 2016-2019, 2010. 査読有

③ Komatsuda A, Wakui H, Iwamoto K, Togashi M, Masai R, Maki N, Sawada K: GATA-3 is upregulated in peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal change nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 71: 608-616, 2009. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 奥山 慎. リツキシマブが奏功したステロイド依存性難治性微小変化型ネフローゼ症候群. 第41回日本腎臓学会東部学術大会. 平成23年10月14日. 東京

② 面川 歩. 抗RNP抗体単独陽性膜性腎症におけるIgGサブクラスの検討. 第54回日本腎臓学会学術総会. 平成23年6月15日. 横浜

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

涌井 秀樹 (WAKUI HIDEKI)  
秋田大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：70240463

##### (2) 研究分担者

小松田 敦 (KOMATSUDA ATSUSHI)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号：70272044