

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15330

研究課題名(和文)ポドサイト濾過フィルターの分子構造と機能調節の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular regulatory mechanism of podocyte, the filtration apparatus of glomeruli

研究代表者

竹居 孝二 (Takei, Kohji)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40322226

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)：ポドサイトは腎糸球体の濾過フィルターの役割をする細胞で、濾過フィルターが形成され、機能するためには、ポドサイトの細胞骨格が制御されることが不可欠である。培養ポドサイトを用いて、アクチン細胞骨格の制御機構を解析した結果、ダイナミン1が微小管を、ダイナミン2がアクチン細胞骨格を制御することを見出した。さらに末梢神経変性疾患であるシャルコー・マリー・トゥース病(CMT)の原因となるダイナミン2のCMT変異により、アクチン細胞骨格が異常となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Podocyte is a cell that forms a glomerular filter for protein filtration. For the formation and the function of the glomerular filter, the cytoskeleton of podocyte needs to be appropriately regulated. However, it is poorly understood how cytoskeletons are regulated in podocyte. In this study, we aimed to elucidate regulatory mechanisms involved in the cytoskeletal regulation using two types of podocyte cell lines, Mouse Podocyte (MPC), and Human Podocyte (HPC). We found that dynamin 1 regulates microtubules, whereas dynamin 2 regulates actin cytoskeleton. Furthermore, we found that expression of dynamin 2 mutation found in Charcot Marie Tooth disease, a neurodegenerative disease, leads to aberrant actin cytoskeleton. These results strongly suggest that dynamin plays an essential role in the regulation of cytoskeleton in podocyte.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ポドサイト 糸球体 ダイナミン アクチン アクチニン

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体ポドサイトは糸球体毛細血管を覆い、濾過機能を担う細胞である。ポドサイトは隣接ポドサイトとの間で足突起嵌合を形成し、足突起嵌合は膜タンパク、ネフリンの分子間相互作用により繋がれており、細胞間隙に構成されるスリット膜が“濾過フィルター”として働く。ポドサイトの足突起はアクチン線維束を主体にした骨格により支持されており、また、アクチン骨格の異常は足突起の消失、スリット膜の形成不全による濾過機能不全を引き起こすことから、アクチン細胞骨格は足突起形成、接着、足突起嵌合形成に重要な役割を果たしていると考えられるが、その制御機構については不明な部分が多い。

2012年、Sodaらはダイナミン、エンドフィリン、シナプトジャニンなどのエンドサイトーシス機能タンパクがポドサイトに発現し、ノックアウトマウスでは糸球体濾過機能低下することを発見したが (Soda et al., J Clin Invest 2012) ポドサイトにおけるこれらの分子の機能は未解明のままである。

本研究代表者は、ダイナミン分子によるアクチンと細胞膜動態の制御機構を明らかにしてきており (Yamada et al., J Neurosci 2013; Yamada et al. BBRC 2009; Ohashi et al., PLoS One 2011) ポドサイトにおいてもダイナミンがアクチン細胞骨格の重要な制御分子であると考え、その機能解明を目指す本研究の提案に至った。さらに、末梢神経変性疾患であるシャルコー・マリー・トゥース病 (CMT) の症例でダイナミンの変異が認められること (Züchner et al., Nat Genet. 2005) CMTの一部の症例では、ポドサイトの機能不全による巣状糸球体硬化症を併発することに着目し、ダイナミン CMT 変異がポドサイトのアクチン細胞骨格制御に及ぼす影響について解析した。

2. 研究の目的

(1) ポドサイト分化培養条件の最適化: 未分化および分化ポドサイトにおける機能分子の局在や細胞骨格を解析するために、培養ポドサイトを用い、分化培養条件を最適化する。

(2) ポドサイトにおけるダイナミンの機能解析: 未分化および分化ポドサイトにおけるダイナミンの発現、局在、機能を明らかにする。

(3) ポドサイトにおけるダイナミン CM 変異の解析: ポドサイトにおけるダイナミン CMT 変異の影響、特にダイナミンの生理的に機能していると考えられる細胞骨格や膜ダイナミクスに対する影響について解析する。

3. 研究の方法

(1) 抗体、試薬: 一次抗体は、ウサギポリクローナル抗ダイナミン 1 抗体 (PA1-660, Thermo Scientific)、ウサギモノクローナル

抗ダイナミン 1 (ab52611, Abcam) ヤギポリクローナル抗ダイナミン 2 抗体 (sc6400, Santa Cruz) マウスモノクローナル抗 Z0-1 抗体 (生理学研究所 古瀬教授より供与) ヤギポリクローナル抗ネフリン抗体 (AF3159, Novus Biologicals) マウスモノクローナル抗シナプトポドイン抗体 (65194, Progen Biotechnik GmbH) マウスモノクローナル抗アクチン抗体 (A5441, Sigma Aldrich) マウスモノクローナル抗 チューブリン抗体 (T5168, Sigma) マウスモノクローナル抗アセチル化チューブリン抗体 (T6793, Sigma) マウスモノクローナル抗 EB1 抗体 (610534, BD Transduction Laboratories) ウサギポリクローナル抗 V5 抗体 (AB3792, Millipore) ウサギポリクローナル抗アクチニン 4 抗体 (0042-05, Immuno Globe) マウスモノクローナル抗パキシリン抗体 (CLSG36825-05, Cedarlane) を使用した。

二次抗体は、Rhodamine Red-X 標識ヤギ抗体ウサギ IgG 抗体 (R6394, Life technologies) Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (A11001, Life technologies) を使用した。

アクチン線維はローダミン標識ファロイジン (Invitrogen) Alexa Fluor 488 標識ファロイジン (A12379, Life technologies) 核は DAPI (342-07431, 同仁化学研究所) にて染色した。Cytochalasin D (C8273, Sigma-Aldrich) Bis-T-23 浅 (静岡県立大学浅井博士より供与) を使用した。

(2) ポドサイト細胞株の培養
マウスポドサイト Mouse podocyte cell (MPC, ハーバード大学 / マサチューセッツ総合病院 Mundel 博士より供与) ヒトポドサイト Human Podocyte cell lines (HPC, プリントル大学 Saleem 博士より供与) を用いた。10% ウシ胎児血清 (FBS) ペニシリン-ストレプトマイシン (PS) 25 mM HEPES pH7.4 及びインシュリン-トランスフェリン-セレニウムサプリメントを希釈添加した RPMI-1640 を使用し、コラーゲンコートしたプラスチック培養皿で、33^oC、5% CO₂ にて増殖維持培養した。培養ポドサイトは 10% FBS、PS、インターフェロン を添加した DMEM を用い、37^oC、5% CO₂ にて培養することにより分化させた。

(3) トランスフェクション: pIRES2-DsRed2, pcDNA4 V5/His にクローニングしたラットダイナミン 2 cDNA (WT および変異型) を導入したプラスミドを Lipofectamine LTX 試薬 (15338-100, Lifetechnologies) を使用してトランスフェクションした (Tanabe and Takei, 2009; Yamada et al., 2016b)。

(4) 蛍光免疫染色および観察: 培養ポドサイトを 4% パラホルムアルデヒドを用いて固定後、常法に従い、膜透過処理、ブロッキング、蛍光免疫染色を施し、封入した。スピニングディスク共焦点スキャノユニット (X-Light Crestoptics) を接続した倒立顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) ポドサイト分化培養条件の最適化: MPC および HPC の培養において、培養皿のコーティング、培養細胞数、分化誘導時期など、培養条件を検討した。その結果、MPC で約 8 割の高頻度で細胞が分化し、細胞間結合を形成する条件を確立した(図 1)。分化は分化マーカーであるシナプトポディンの発現、局在により確認した。分化に伴い、ポドサイトの偏平化、巨大化、アクチンや微小管など細胞骨格の再編、ZO1 陽性の細胞間結合の形成が

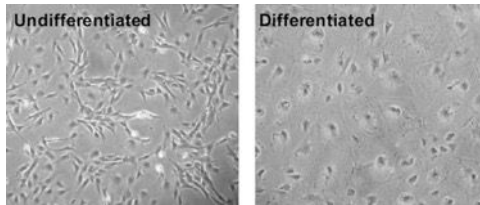


図 1 . 未分化および分化 MPC (DIC 像)

認められた。

(2) ポドサイトにおけるダイナミンの機能解析: 培養 MPC にダイナミン 1 およびダイナミン 2 が発現することをウエスタンブロットにより確認した。そこで、MPC の蛍光免疫染色により、ダイナミン 1 およびダイナミン 2 の局在を調べた。両アイソフォームともに、未分化ポドサイトでは点状に局在したが、分化ポドサイトではダイナミン 1 は微小管に局在し、放射状、線維状の染色像として観られた(図 2、3)。一方、ダイナミン 2 は、分化ポドサイトでは皮質アクチンやストレスファイバーなど、アクチン線維と共同在し

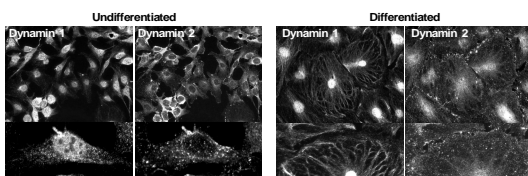


図 2 . 未分化および分化 MPC におけるダイナミン 1、ダイナミン 2 の局在

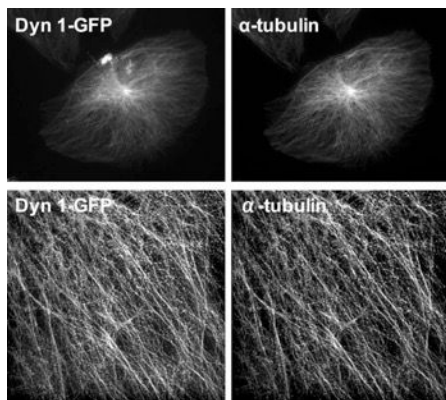


図 3 . GFP ダイナミン 1 の微小管への局在

た(図 2)。分化ポドサイトにおけるダイナミン 1 の微小管局在、ダイナミン 2 のアクチン細胞骨格への局在は、それぞれ、微小管脱

重合剤、アクチン脱重合剤により消失した。また、ダイナミン阻害剤により微小管の安定性が低下した。これらの結果から、ポドサイトにおいてダイナミン 1 が細胞骨格のダイナミクスを制御することが強く示唆された。(3) ポドサイトにおけるダイナミン CMT 変異の解析: CMT 変異の原因となる変異ダイナミン 2 K562E の発現が、ストレスファイバーの形成不全とアクチンの凝集をもたらすことを、ヒト骨肉腫細胞株 U20S を用いた解析により明らかにした(Yamada et al., Neurosci lett. 2016)。次に、ポドサイトにおいてもダイナミン 2 CMT 変異が同様のアクチン細胞骨格の異常をもたらすことを、HPC を用いて示した(図 4)。ダイナミン 2 K562E 発現により形成された異

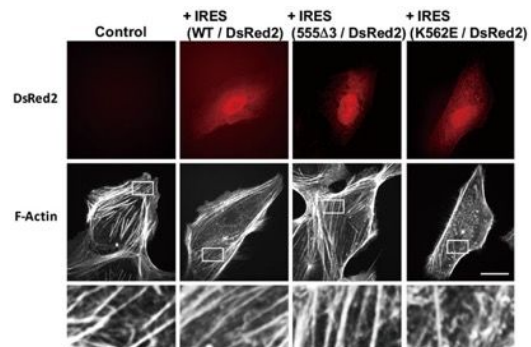


図 4 . ダイナミン 2 WT および CMT 変異発現 HPC におけるアクチン細胞骨格の変化

常なストレスファイバーには、ダイナミン 2 K562E が強く局在し、 α アクチニン 4 との共同在も認められた(図 5、6)。



図 5 . ダイナミン 2 WT および K562E 発現 HPC におけるダイナミンとアクチン線維の局在

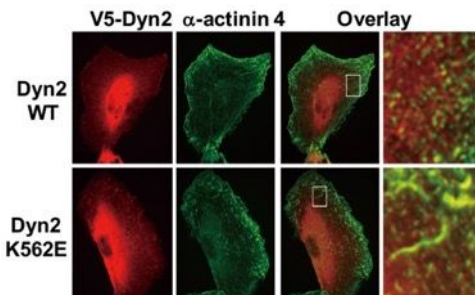


図 6 . ダイナミン 2 WT および K562E 発現 HPC におけるダイナミンと α アクチニンの局在

さらに、パキシリンを指標として接着斑の形成を調べたところ、K562E 発現細胞では WT 発現細胞に比べ接着斑の数が減少した。

アクチン線維束形成に対するダイナミン2 K562Eの影響を調べるため、Cytochalasin Dによりアクチンを脱重合させ、洗浄後のストレスファイバーの形成を観察したところ、K562E発現細胞では、WT発現細胞に比べ、その形成量は顕著に減少していた。ダイナミン2 K562Eの発現によるストレスファイバー及び接着斑の形成低下は、ダイナミンの重合促進剤 Bis-T-23 処理においても改善しなかった。

以上より、ダイナミン2 K562Eの発現はポドサイトのストレスファイバー及び接着斑形成を阻害することが強く示唆された。ストレスファイバー及び接着斑の形成低下はスリット膜の形成不全及びポドサイトの基底膜からの脱離につながると予想され、ポドサイトの機能不全に由来する巣状系球体硬化症の発症原因の一つになる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Takeda, T., Kozai, T., Yang, H., Ishikuro, D., Seyama, K., Kumagai, Y., Abe, T., Yamada, H., Uchihashi, T., Ando, T., Takei, K. (2018) Dynamic clustering of dynamin-amphiphysin helices regulates membrane constriction and fission coupled with GTP hydrolysis. *Elife*. e30246. doi: 10.7554/eLife.30246. (査読有)
2. Zhang, Y., Nolan, M., Yamada, H., Watanabe, M., Nasu, Y., Takei, K., Takeda, T. (2016) Dynamin 2 GTPase contributes to invadopodia formation in invasive bladder cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 480, 409-414. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.063. (査読有)
3. Yamada, H., Takeda, T., Michiue, H., Abe, T., Takei, K. (2016a) Actin bundling by dynamin 2 and cortactin is implicated in cell migration by stabilizing filopodia in human non-small cell lung carcinoma cells. *Int J Oncol*. 49, 877-886. doi: 10.3892/ijo.2016.3592. (査読有)
4. Yamada, H., Kobayashi, K., Zhang, Y., Takeda, T., Takei, K. (2016b) Expression of a dynamin 2 mutant associated with Charcot-Marie-Tooth disease leads to aberrant actin dynamics and lamellipodia formation. *Neurosci Lett*. 628, 179-185. doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.030. (査読有)
5. Hayashi, K., Michiue, H., Yamada, H., Takata, K., Nakayama, H., Wei, F.Y., Fujimura, A., Tazawa, H., Asai, A., Ogo,

N., Miyachi, H., Nishiki, T., Tomizawa, K., Takei, K., Matsui, H. (2016) Fluvoxamine, an anti-depressant, inhibits human glioblastoma invasion by disrupting actin polymerization. *Sci Rep*. 6, 23372. doi: 10.1038/srep23372. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

1. 山田浩司、小林絹枝、張羽白、竹田哲也、竹居孝二、シャルコマリートゥース病の原因遺伝子の一つであるダイナミン2の変異は細胞の異常なアクチン動態とラメリポディア形成の減少をもたらす、第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)
2. 石黒大輝、竹田哲也、小財稔矢、熊谷祐介、脊山佳穂、楊恵然、山田浩司、内橋貴之、安藤敏夫、竹居孝二、高速AFMによるダイナミン1-アンフィファイジン複合体の動態観察、第54回日本生物物理学会年会、2016年11月26日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)
3. 橘洋美、竹田哲也、山田浩司、小川大輔、竹居孝二、腎系球体ポドサイトにおけるダイナミンアイソフォームの局在と機能、第68回日本細胞生物物理学会年会、2016年06月15日~17日、京都テルサ(京都市)
4. Tadashi Abe, Hiroshi Yamada¹, Tetsuya Takeda, Kinue Kobayashi, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Kohji Takei, Dynamin-Cortactin Ring Complex Physically Bundles Actin Filaments and Protects the Bundle from Depolarization. IGER Int'l Symposium (国際学会) 2016年12月12-13、名古屋大学(名古屋市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹居 孝二 (Takei, Kohji)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 40322226

(2) 研究分担者

小川 大輔 (Ogawa, Daisuke)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 70535195