

平成 21年 4月 27日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2006～2008
課題番号：18590877
研究課題名（和文） 糸球体濾過バリアー構成分子アクチニン4と相互作用する因子と情報伝達における意義
研究課題名（英文） Signaling factors that interact with actinin-4, a component molecule of the glomerular filtration barrier
研究代表者 涌井 秀樹 (WAKUI HIDEKI) 秋田大学・医学部・准教授 研究者番号：70240463

研究成果の概要：腎の糸球体濾過バリアー機能に情報伝達系が重要であり、微小変化型ネフローゼ症候群（MCNS）の病因にバリアー破綻因子が想定されている。本研究で、バリアー構成分子アクチニン4と相互作用するOK/SW-CL.16蛋白を同定した。構造上の特徴から情報伝達系蛋白の可能性が高く、この相互作用はバリアー機能維持に重要と考えられた。また、MCNS症例の末梢血でTh2サイトカインの優位性を認め、バリアー破綻因子の同定に示唆を与えた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

研究分野：腎臓内科学

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、(8) 蛋白尿

1. 研究開始当初の背景

腎には糸球体濾過バリアーが存在し、血漿蛋白の尿中漏出を防いでいる。近年、このバリアーを構成する分子群が同定され、これら分子間相互作用による情報伝達系がバリアー機能維持に重要であることが示唆されてきている。糸球体疾患、特に微小変化型ネフローゼ症候群（MCNS）の発症

機序を解明する上で、これら分子間相互作用の解析が重要な研究課題になってきている。

アクチニン4は糸球体濾過バリアーを構成するポドサイトに発現し、その機能維持に重要な要素であることが示され、種々の分子との相互作用の可能性が示唆されている。

MCNSの病因に関しては、末梢血Tリンパ球が糸球体濾過バリアー機能を破綻させる因子を産生する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

(1) 腎の糸球体濾過バリアー機能維持の機序を更に検討する目的で、ポドサイトに発現してアクチニン4と相互作用する新規情報伝達系因子を同定する。

(2) MCNSの発症に関与する糸球体濾過バリアー機能破綻因子同定の手掛かりを得る目的で、MCNS症例の末梢血 Th1/Th2 サイトカイン不均衡の有無を検討する。

本研究開始当初は(1)を検討課題とし、3年目の後半から(2)の検討も行った。

3. 研究の方法

(1) アクチニン4と相互作用する腎因子の検索

① 大腸菌 two-hybrid スクリーニング
これまでの研究から分子間相互作用に重要と推定されるアクチニン4の R1 ドメインを含むフラグメント(202-379)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フラグメントと相互作用する陽性クローンを得、この cDNA がコードする蛋白を同定した。

② In vitro 結合実験

①で同定した腎蛋白とアクチニン4フラグメントとの結合を in vitro 結合実験(pull-down法)で確認した。大腸菌で作製したリコンビナント蛋白と腎から抽出した全長アクチニン4を用いた。

③ 組織 cDNA パネルスクリーニング

①で同定した腎蛋白 mRNA の全身主要組織での発現様式を、組織 cDNA パネルを用いて検討した。

④ In situ hybridization

①で同定した腎蛋白 mRNA の糸球体内発現様式を、腎生検試料を用いて検討した。

(2) MCNS 症例の末梢血 Th1/Th2 サイトカイン不均衡の検索

① 末梢血単核球 cDNA の調整

末梢血単核球を MCNS 症例のネフローゼ期と寛解期(25例)、膜性腎症(MN)のネフローゼ期(17例)、および健常人(25例)から採取して全 mRNA を抽出し、cDNA を調整した。

② Real-time RT-PCR による mRNA 発現量の

定量化

①で調整した資料を用い、Th1 転写因子(T-bet)、Th1 サイトカイン(IFN- γ)、Th2 転写因子(GATA-3)、Th2 サイトカイン(IL-13)に特異的なプライマーによる real-time RT-PCR を行った。各々の値はハウスキーピング酵素遺伝子の値で標準化した。

③ 統計学的検討

MCNS ネフローゼ期と寛解期、MN ネフローゼ期、健常人の試料間での Th1/Th2 関連分子 mRNA 発現量について、統計学的に有意差を検討した。MCNS ネフローゼ期に有意に発現が亢進している Th1/Th2 関連分子の結果から、Th1/Th2 不均衡を推定した。

4. 研究成果

(1) アクチニン-4 と class I PxxP モチーフを有し、腎糸球体のポドサイトに発現する OK/SW-CL. 16 蛋白との相互作用

① 大腸菌 two-hybrid スクリーニング

ヒト腎 cDNA ライブラリーのスクリーニングの結果、アクチニン4の R1 ドメインを含むフラグメント(202-379)と相互作用する OK/SW-CL. 16 蛋白の全長をコードする cDNA を同定した。

推定される OK/SW-CL. 16 蛋白のアミノ酸配列を図1に示す。情報伝達分子との相互作用を示唆する I 型 PxxP モチーフ、既知のアクチニン結合蛋白に共通して存在するセグメントに類似した配列、さらに、複数の分子と相互作用してこれらを連結する機能を有する情報伝達関連蛋白 RIM1 蛋白の一部と類似するフラグメントを認めた。

1 MTPNRGPLSPNDLRPSHVISLPLHNAPHTRPTNQHTNHI

41 PMMARCNRKHIPRPPHTTCPKRPSIRDNPIYYLRSFFLR
Class I

81 RIFLSLLPLQSPYPPTRRALAPNRHHFPAKSPRSPTPKHI
Act-IR? RIM1-like

121 RITRIRSINHLSSP

Class I : Class I PxxP モチーフ

Act-IR : 推定されるアクチニン結合部位

RIM1-like : RIM1 蛋白類似配列部位

図1. OK/SW-CL. 16 蛋白の推定アミノ酸配列

② In vitro 結合実験

リコンビナントのアクチニン4(202-379)および腎から抽出した全長アクチニン4と、リコンビナントの全長 OK/SW-CL. 16 蛋白との結合性を確認した。

③ 組織 cDNA パネルスクリーニング

OK/SW-CL. 16 mRNA の腎での発現を確認した。また、腎以外にも全身の主要な組織に広く発現していることが示された。

④ In situ hybridization

腎糸球体のポドサイトとメサンギウム細胞に OK/SW-CL. 16 蛋白 mRNA の発現を認めた (図 2)。

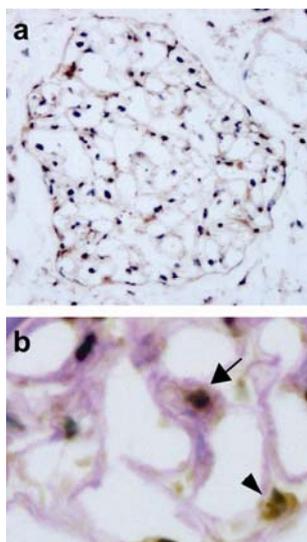


図 2. OK/SW-CL. 16 蛋白 mRNA の糸球体内発現

- a: 弱拡大像
mRNA 発現細胞: 茶色に染色されている
- b: 強拡大像
矢頭: ポドサイト
矢印: メサンギウム細胞

(2) MCNS 症例の末梢血 Th1/Th2 不均衡

末梢血単核球の real-time RT-PCR の結果、MCNS 症例のネフローゼ期で寛解期に比して GATA-3 と IL-13 の mRNA が高発現しており、これらの高発現は MN のネフローゼ期および健常人と比しても有意であった。

一方、T-bet と IFN- γ の mRNA の発現量は各グループ間で有意差を認めなかった。

(3) 本研究で得られた成果の考察

① アクチニン 4 と OK/SW-CL. 16 蛋白との相互作用

大腸菌 two-hybrid スクリーニングにより、アクチニン 4 の新規相互作用分子として OK/SW-CL. 16 蛋白を同定した。In vitro 結合実験でも両者の結合性を確認した。OK/SW-CL. 16 蛋白の mRNA は全身の主要な組織に広く発現し、腎糸球体ではポドサイ

トとメサンギウム細胞に発現を認めた。

OK/SW-CL. 16 蛋白の推定アミノ酸配列には既知のアクチニン結合蛋白に共通して存在するセグメント、情報伝達分子との相互作用を示唆する I 型 PxxP モチーフ、情報伝達関連蛋白 RIM1 蛋白の一部と類似するフラグメントを認めた。これら構造上の特徴から、アクチニン 4 と情報伝達系を仲介する働きが推測される。糸球体のポドサイトに mRNA の発現を認めたことから、糸球体濾過バリアー機能維持に重要な構成因子と思われる。

以上の成果は糸球体濾過バリアーの国内外の研究に寄与するものであり、実験腎臓病学の国際雑誌 (Nephron Experimental Nephrology) に掲載された。アクチニン 4 と OK/SW-CL. 16 蛋白との相互作用の生理的意義については今後の検討課題である。

② MCNS 症例の末梢血 Th1/Th2 サイトカイン不均衡

表 1 に MCNS 症例のネフローゼ期における末梢血 Th1/Th2 サイトカイン不均衡に関する過去の報告例と本研究の結果を比較した。

表 1. MCNS 症例のネフローゼ期における末梢血 Th1/Th2 サイトカイン不均衡の報告例

著者	Th1		Th2	
	T-bet	IFN- γ	GATA-3	IL-13
Daniel	ND	↑	ND	ND
Yap	ND	NS	ND	↑
Stachowski	ND	↓	ND	ND
Lama	ND	↑	ND	ND
本研究	NS	NS	↑	↑

ND: 検討せず NS: 有意差なし

代表的な Th1 サイトカインである IFN- γ については過去の報告例で mRNA 発現様式の結果が一致せず、本研究ではその発現量に変化を認めなかった。本研究では Th1 転写因子である T-bet も更に検討したが、mRNA 発現量の変化は認めなかった。

一方、代表的な Th2 サイトカインである IL-13 については、Yap らが mRNA 高発現を指摘していたが、本研究はこれを支持した。更に、Th2 転写因子である GATA-3 の mRNA 高発現を初めて観察し、Th2 サイトカインの優位性が MCNS 発症に重要であることを示した。

MCNS で想定されている糸球体濾過バリアー破綻因子を検索する上で、今後の国内外の研究に示唆を与える成果であり、臨床腎臓病学の国際雑誌 (Clinical Nephrology) に掲載予定である。

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 Komatsuda A, Wakui H, Iwamoto K, Togashi M, Masai R, Maki N, Sawada K: GATA-3 is up-regulated in peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal change nephrotic syndrome. Clinical Nephrology (in press). 査読有り
- ② Togashi M, Okuyama S, Wakui H, Komatsuda A, Suzuki D, Toyoda M, Sawada K: Interaction of alpha-actinin-4 with class I PxxP motif-containing OK/SW-CL. 16 protein. Nephron Experimental Nephrology 107 (2): e65-e72, 2007. 査読有り
- ③ 涌井秀樹, 小松田 敦: 微小変化型ネフローゼ症候群. 日本臨牀 64 卷(増刊 2): 408-412, 2006. 査読無し

[学会発表] (計2件)

- ① 小松田 敦. 微小変化型ネフローゼ症候群発症期の末梢血単核球では転写因子 GATA3 mRNAが高発現する. 第51回日本腎臓学会学術総会. 平成20年6月1日. 福岡市.
- ② 富樫賢. Actinin-4 と class I PxxP モチーフを有する OK/SW-CL. 16 との相互作用. 第 50 回日本腎臓学会学術総会. 平成 19 年 5 月 25 日. 浜松市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

涌井 秀樹 (WAKUI HIDEKI)
秋田大学・医学部・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
畠山 卓 (Hatakeyama Takashi)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号: 20422149

(3) 連携研究者

なし