

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07872

研究課題名(和文) Cubilin変異機能解析による蛋白尿発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of proteinuria mediated by Cubilin

研究代表者

張田 豊 (Harita, Yutaka)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10451866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎近位尿細管や腸管上皮ではCubilinとAmnionlessからなる膜蛋白複合体により低分子蛋白質が(再)吸収される。本研究では、Cubilin機能を制御する分子メカニズムの解明を目指した。検討の結果アルブミンとCubilinのC末端領域に結合すること、またその結合を介したエンドサイトーシス不全が蛋白尿の原因となることを明らかにした。核小体蛋白質のNVLがAmnionlessの細胞内領域に結合することがCubilinとそれに結合したアルブミンのエンドサイトーシスを制御するという新しい尿細管再吸収の分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、尿細管における蛋白質の再吸収の新たな分子機序が明らかになった。蛋白尿は多くの腎疾患の発症進展において重要な役割を果たしており、そのメカニズムや治療標的を検討する上で重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Cubilin (CUBN) and amnionless (AMN), expressed in kidney and intestine, form a multiligand receptor complex called CUBAM that plays a crucial role in albumin absorption. Here, we describe a quantitative assay to evaluate albumin uptake by CUBAM using cells expressing full-length CUBN and elucidate the crucial roles of the C-terminal part of CUBN and the endocytosis signal motifs of AMN in albumin endocytosis. We also demonstrate that nuclear valosin-containing protein-like 2 (NVL2), an interacting protein of AMN, is involved in this process. Although NVL2 was mainly localized in the nucleolus in cells without AMN expression, it was translocated to the extranuclear compartment when coexpressed with AMN. NVL2 knockdown significantly impaired internalization of the CUBN-albumin complex in cultured cells, demonstrating an involvement of NVL2 in endocytic regulation. These findings uncover a link between membrane and nucleolar proteins that is involved in endocytic processes.

研究分野：小児科学

キーワード：蛋白尿 尿細管 Cubilin Amnionless アルブミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎近位尿細管や腸管上皮では刷子縁に発現する Cubilin は Amnionless と結合し、Amnionless 依存的に細胞膜に輸送されることにより低分子蛋白質を(再)吸収する蛋白受容体として機能する。

Cubilin は 3623 アミノ酸からなる巨大分子であり、そのリガンドには様々な低分子蛋白質や、内因子と結合したビタミン B12 も含まれるため、Cubilin 遺伝子(*CUBN*)の変異や欠損では腎尿細管での再吸収障害とビタミン B12 欠乏性貧血を呈する (Imerslund—Grasbeck syndrome)。Amnionless は Cubilin と結合し細胞膜に局在させる機能を持つため、Amnionless 遺伝子(*AMN*)異常も IGS の原因となる。すなわち Amnionless と Cubilin は、腸管上皮や腎尿細管上皮細胞のエンドサイトーシスに不可欠である。

Cubilin は IGS という希少遺伝性疾患の原因であるばかりではなく、広く蛋白尿や様々な腎疾患と関係することが近年知られるようになってきた。例えば複数のゲノムワイド関連解析 (GWAS)により、アルブミン尿と強い相関する唯一の因子として *CUBN* の多型(rs1801239, 12984V)が同定されている。また *CUBN* の別の多型(rs7918972)は、末期腎不全や腎移植後の移植腎機能不全と相関するとされる。また一部の *CUBN* 変異は遺伝性ネフローゼ症候群の原因にもなり、多量の蛋白を呈する。

しかし Cubilin の局在や機能を細胞内で再現するシステムの構築は困難であり、これまでその変異や多型が機能障害を起こすメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では(i)Cubilin と Amnionless の膜発現はどのように制御されているのか、(ii)アルブミン尿と関連する *CUBN* の多型や新規変異はどのようにして蛋白尿を惹起するのか、を明らかにすることを目的とした。

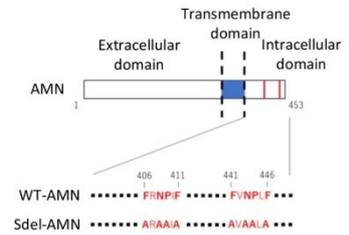
3. 研究の方法

全長 Cubilin(3623 アミノ酸)の発現ベクターを作成し、様々な変異を導入してその膜移行やリガンドとの結合を検討した。具体的にはヒト腎臓由来培養細胞より抽出した cDNA を用いて、Cubilin 全長配列を複数のセグメントに分割してそれぞれを PCR で増幅し、Gibson Assembly を用いて接合した。全長発現ベクターを用いて Cubilin 変異体や多型についてその糖鎖修飾や膜発現への影響を網羅的に評価した。さらにリガンドであるアルブミンを細胞に添加してその細胞内への取り込みを定量化するシステムを構築した。また Cubilin や Amnionless に結合する蛋白質をプロテオミクス(SILAC 法)により網羅的に解析し、その結合分子がこれらの膜移行やエンドサイトーシスにどのように影響するかを検討した。

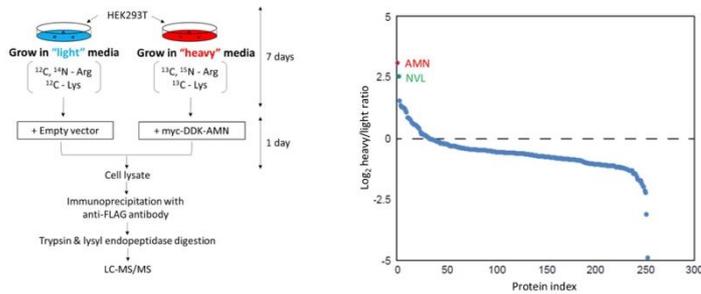
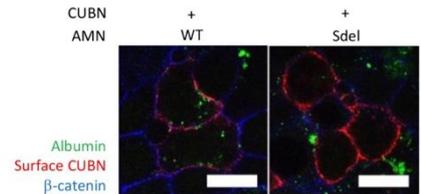
4. 研究成果

まず、Amnionless 全長発現ベクターと Cubilin 全長発現ベクターを培養細胞に導入し、FACS を用いて in vitro で Cubilin の膜発現を定量的に評価する系を構築した。またこのシステムを用いてアルブミンのエンドサイトーシスを定量的に評価することに成功した。このシステムを用

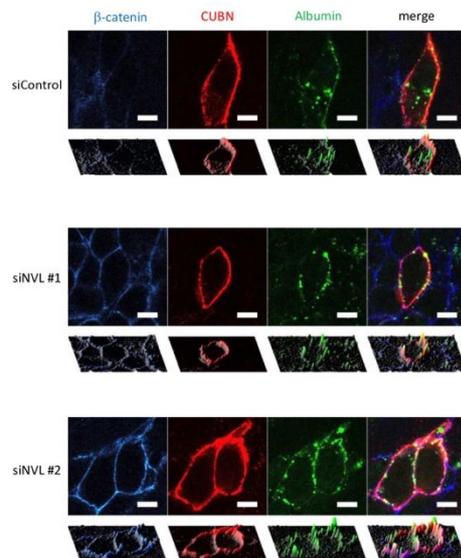
いた解析の結果、Cubilin を介したアルブミンのエンドサイトーシスには Cubilin の N 末ではなく、C 末端を含んだ全長が必要であることが判明した。また、Amnionless の変異体を導入して検討した結果、Cubilin のエンドサイトーシスには Amnionless の細胞内領域の二つのシグナル配列が重要であった(右図)。



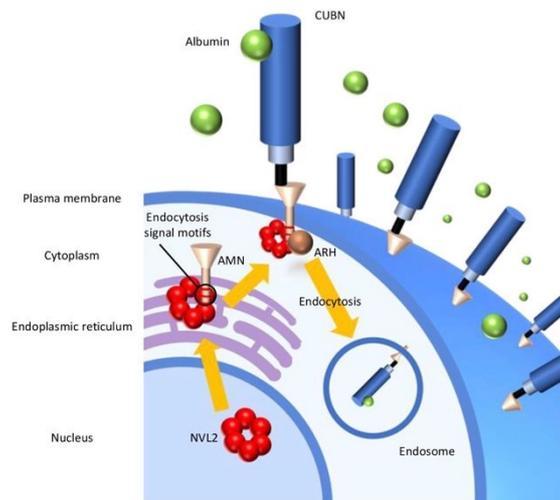
プロテオミクス解析により Amnionless の新規結合分子として NVL を同定した(下図)。NVL は核小体に存在しているが、Amnionless と共発現すると核小体から核外へ移動した。NVL は Amnionless の細胞内領域の特にシグナル配列部分に結合した



この領域はAmnionlessを介したCubilinのエンドサイトーシスに与するため、NVLがCubilinやアルブミンのエンドサイトーシスに与するかどうかを検討した。NVLをノックダウンした細胞ではCubilinおよびCubilinに結合したアルブミンのエンドサイトーシスが抑制されることが判明した。すなわち核小体蛋白質のNVLがAmnionlessの細胞内領域に結合することがCubilinのエンドサイトーシスを制御するという新しい尿管再吸収の分子メカニズムを明らかにした。



本研究により、蛋白尿が重要な役割を果たす多くの腎疾患の発症進展メカニズムを理解する上で重要な知見が得られた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanda Shoichiro, Ohmuraya Masaki, Akagawa Hiroyuki, Horita Shigeru, Yoshida Yasuhiro, Kaneko Naoto, Sugawara Noriko, Ishizuka Kiyonobu, Miura Kenichiro, Harita Yutaka, Yamamoto Toshiyuki, Oka Akira, Araki Kimi, Furukawa Toru, Hattori Motoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Deletion in the Cobalamin Synthetase W Domain Containing Protein 1 Gene Is associated with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 139 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2019040398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oda Yoichiro, Uchiyama Yuri, Motomura Ai, Fujita Atsushi, Azuma Yoshiteru, Harita Yutaka, Mizuguchi Takeshi, Yanagi Kumiko, Ogata Hiroko, Hata Kenichiro, Kaname Tadashi, Matsubara Yoichi, Wakui Keiko, Matsumoto Naomichi	4. 巻 64
2. 論文標題 Entire FGF12 duplication by complex chromosomal rearrangements associated with West syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-019-0641-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Taeko, Harita Yutaka, Takizawa Keiichi, Urae Seiya, Ishizuka Kiyonobu, Miura Kenichiro, Horita Shigeru, Ogino Daisuke, Tamiya Gen, Ishida Hideki, Mitsui Tetsuo, Hayasaka Kiyoshi, Hattori Motoshi	4. 巻 4
2. 論文標題 In Vivo Expression of NUP93 and Its Alteration by NUP93 Mutations Causing Focal Segmental Glomerulosclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 1312 ~ 1322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2019.05.1157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harita Yutaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Application of next-generation sequencing technology to diagnosis and treatment of focal segmental glomerulosclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 491 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-017-1449-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 張田豊	4. 巻 59
2. 論文標題 腎疾患に対する遺伝子診断	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児科	6. 最初と最後の頁 1379-1385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 張田豊	4. 巻 38
2. 論文標題 小児腎疾患における遺伝子診断の実際	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本小児腎不全学会雑誌	6. 最初と最後の頁 23-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 張田豊	4. 巻 40
2. 論文標題 遺伝子から見た嚢胞性腎疾患	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 じん	6. 最初と最後の頁 4-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harita Yutaka, Urae Seiya, Akashio Riki, Isojima Tsuyoshi, Miura Kenichiro, Yamada Takeshi, Yamamoto Katsusuke, Miyasaka Yasunori, Furuyama Masayuki, Takemura Tsukasa, Gotoh Yoshimitsu, Takizawa Hideki, Tamagaki Keiichi, Ozawa Atsushi, Ashida Akira, Hattori Motoshi, Oka Akira, Kitanaka Sachiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical and genetic characterization of nephropathy in patients with nail-patella syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1414 ~ 1421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41431-020-0655-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Eiji, Yoshida Amine, Miyama Yudai, Yabuuchi Tomoo, Kajiho Yuko, Kanda Shoichiro, Miura Kenichiro, Oka Akira, Harita Yutaka	4. 巻 65
2. 論文標題 Incomplete cryptic splicing by an intronic mutation of OCRL in patients with partial phenotypes of Lowe syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 831 ~ 839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0773-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harita Yutaka, Urae Seiya, Akashio Riki, Isojima Tsuyoshi, Miura Kenichiro, Yamada Takeshi, Yamamoto Katsusuke, Miyasaka Yasunori, Furuyama Masayuki, Takemura Tsukasa, Gotoh Yoshimitsu, Takizawa Hideki, Tamagaki Keiichi, Ozawa Atsushi, Ashida Akira, Hattori Motoshi, Oka Akira, Kitanaka Sachiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical and genetic characterization of nephropathy in patients with nail-patella syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1414 ~ 1421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41431-020-0655-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Urae Seiya, Harita Yutaka, Udagawa Tomohiro, Ode Koji L., Nagahama Masami, Kajiho Yuko, Kanda Shoichiro, Saito Akihiko, Ueda Hiroki R., Nangaku Masaomi, Oka Akira	4. 巻 133
2. 論文標題 A cellular model of albumin endocytosis uncovers a link between membrane and nuclear proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs242859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.242859	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikkawa Yamato, Hashimoto Taeko, Takizawa Keiichi, Urae Seiya, Masuda Haruka, Matsunuma Masumi, Yamada Yuji, Hamada Keisuke, Nomizu Motoyoshi, Liapis Helen, Hisano Masataka, Akioka Yuko, Miura Kenichiro, Hattori Motoshi, Miner Jeffrey H., Harita Yutaka	4. 巻 6
2. 論文標題 Laminin 2 variants associated with isolated nephropathy that impact matrix regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e145908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.145908	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浦江 聖也, 張田 豊, 宇田川 智宏, 大出 晃士, 長浜 正巳, 上田 泰己, 南学 正臣, 岡 明
2. 発表標題 核小体蛋白によるアルブミンエンドサイトーシス制御機構
3. 学会等名 日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦江聖也、張田豊、宇田川智宏、大出晃士、長浜正巳、南学正臣、岡明
2. 発表標題 Nuclear valosin-containing protein-like(NVL)は Amnionlessと結合し Cubilinのエンドサイトーシスを制御する
3. 学会等名 分子腎臓フォーラム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	神田 祥一郎 (Kanda Shoichiro) (60632651)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------