

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790719

研究課題名（和文） 糸球体上皮細胞シグナル伝達系のプロテオミクス解析による
蛋白尿発症機序の解明

研究課題名（英文）

研究代表者 張田 豊（ HARITA YUTAKA ）

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・特任助教

研究者番号：10451866

研究成果の概要（和文）：

腎糸球体濾過機能におけるバリアー機能は糸球体上皮細胞間の細胞接着装置であるスリット膜構造が担っている。最近ではNephrinやNeph1といったスリット膜を構成する蛋白質が同定され、その分子構造が明らかになってきており、さらにNephrinやNeph1がその細胞内領域がチロシンリン酸化により修飾を受けることが報告されている。本研究ではプロテオミクス技術を用いてNephrinのリン酸化によって制御されるスリット膜構造のダイナミクスを網羅的に解析し、それが糸球体上皮細胞の機能、構造にどのような影響をあたえるか、さらにNephrinを発端とするシグナル伝達系の破綻がいかに蛋白尿の発症に関わっているかを検討した。その結果Nephrinの細胞内領域のチロシンリン酸化によりPLC- γ 1を含む種々のアダプタータンパク質が細胞膜表面にリクルートされ、Nephrinがカルシウムシグナル等のシグナル伝達を行うプラットフォームとして機能する機構が明らかになった。これらの結果は糸球体上皮細胞のバリアー機能を担うシグナル複合体としてのスリット膜の新たな役割を提示するものとなった。

研究成果の概要（英文）：

A specialized intercellular junction between podocytes, known as the slit diaphragm (SD), forms the essential structural framework for glomerular filtration in the kidney. In addition, mounting evidence demonstrates that SD also plays a crucial role as a signaling platform in physiological and pathological states. Nephrin, the major component of SD, is tyrosine phosphorylated by a Src-family tyrosine kinase, Fyn, in developing or injured podocytes. In this study, we performed proteomic analysis searching for proteins binding with phosphorylated Nephrin, and identified several novel interacting protein including phospholipase C- γ 1PLC- γ 1. Furthermore, phosphorylation of Nephrin is directly involved in Ca^{2+} homeostasis via the recruitment and activation of PLC- γ 1. These results strongly suggest that the SD structure is directly linked to Ca^{2+} signaling by PLC- γ 1, and demonstrate a novel role of SD as an orchestrator of versatile signaling pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
H20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
H21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腎・泌尿器学

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体の主な役割は濾過機能である。この濾過障壁は小分子溶質の透過性は高く、高分子蛋白の透過性は低いという特徴を持つ。近年糸球体上皮細胞間の細胞接装置であるスリット膜構造を構成する蛋白質 (Nephrin, Neph1, Podocin, TRPC6) の遺伝子変異がネフローゼ症候群(血漿中の蛋白質が尿に漏出される病態)の発症をきたす事から、スリット膜が限外濾過の主要因である事が明らかになってきた。近年さらにスリット膜の主構成要素である Nephrin がチロシンキナーゼの Fyn によりリン酸化をうける事、さらにそれが腎発生や病態生理と深く関連する事が指摘され始めていた。

2. 研究の目的

本研究ではこの解析をすすめプロテオミクス技術を用いて Nephrin のリン酸化によって制御されるスリット膜構造のダイナミクスを網羅的に解析し、それが糸球体上皮細胞の機能、構造にどのような影響をあたえるか、さらに Nephrin を発端とするシグナル伝達系の破綻がいかに蛋白尿の発症に関わっているかを検討する。

3. 研究の方法

糸球体上皮細胞におけるシグナル伝達解析という現象の詳細と、それらが蛋白尿/ネフローゼ症候群発症という臨床像にいかに関与するかを調べるため、生化学的、分子生物学的、さらに腎臓病学的領域を横断的にカバーする研究を行った。具体的には以下の三つについて検討を行った。(I)リン酸化 Nephrin 結合蛋白質の網羅的解析、(II)リン酸化 Nephrin と結合蛋白質によるシグナル伝達系の解析、(III)腎発生およびネフローゼ症候群発症におけるスリット膜リン酸化シグナルの意義の解析、である。

4. 研究成果

(I)リン酸化 Nephrin 結合蛋白質の網羅的解析 Nephrin の細胞内領域を *in vitro* でリン酸化し、そのリン酸化チロシン残基を同定したところ、Y1204, Y1228 など強くリン酸化されるチロシン残基のほか、多くのチロシンがリン酸化される可能性が示唆された。また質量分析を用い、リン酸化 Nephrin に特異的に結合する蛋白質として PI3Kp53, Crk family proteins, および PLC- γ 1 を同定した。PLC-

1 は糸球体では糸球体上皮細胞に非常に高発現していた。PLC- γ 1 はその SH2 ドメインを介して Nephrin の Y1204 のリン酸化に特異的に結合した。

(II)リン酸化 Nephrin と結合蛋白質によるシグナル伝達系の解析

Nephrin リン酸化の下流を検討するため、Nephrin の細胞内領域と CD8 の細胞外領域を融合させたキメラ蛋白を発現する系を作製し、抗 CD8 抗体を作用させることにより融合蛋白をクラスターリングし、Nephrin の細胞内領域を特異的にリン酸化させるに成功した。この系を用いる事で Nephrin pY1204 の特異的なリン酸化を介して Nephrin の近傍に PLC-1 がリクルートされること、また Nephrin Y1204 のリン酸化により PLC- γ 1 が活性化される事を PLC- γ 1 のリン酸化特異的抗体を用いて明らかにした。

さらにカルシウムイメージングの手法を用いて Nephrin クラスターリング時の細胞内カルシウム濃度の変化を観察したところ、Nephrin pY1204 のリン酸化の下流で PLC-1 の活性化により細胞内 ER および細胞外の両者からカルシウム流入が起こり、カルシウム濃度が増大する事、すなわち Nephrin のリン酸化が糸球体上皮細胞のカルシウムシグナルと直接関係する事が明らかになった。

(III)腎発生およびネフローゼ症候群発症におけるスリット膜リン酸化シグナルの意義の解析

これらの Nephrin シグナルが *in vivo* の蛋白尿発症と関係しているかどうかを調べるためネフローゼ発症モデル動物 (プロタミン硫酸腎症) での解析を行い、糸球体上皮細胞傷害時に Nephrin Y1204 の著明なリン酸化、および PLC- γ 1 の細胞膜へのリクルート、さらに PLC- γ 1 の活性化が起こっている事を見いだした。

今回の研究は、スリット膜分子が濾過フィルターとしての構造としての役割だけではなく、細胞内シグナルを幅広く制御する事を示すもので、シグナル伝達機構の破綻がネフローゼ発症の病態を説明しうる可能性を示唆している。

最近では同じくスリット膜に存在する TRPC6 というカルシウムチャネルの活性型変異により糸球体硬化症が発症する事が明らかになっており、今回明らかにしたカルシウムシグナルの上流としての Nephrin のリン酸化は幅広い糸球体上皮細胞傷害でのメカニ

ズムで生じている可能性も示唆される。現在 TRPC6 についてもリン酸化を介したシグナル伝達に関して検討を進めている。

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 件)

1. Sekine T, Konno M, Sasaki S, Moritani S, Miura T, Wong WS, Nishio H, Nishiguchi T, Ohuchi MY, Tsuchiya S, Matsuyama T, Kanegane H, Ida K, Miura K, Harita Y, Hattori M, Horita S, Igarashi T, Saito H, Kunishima S. Patients with Epstein-Fechtner syndromes owing to MYH9 R702 mutations develop progressive proteinuric renal disease. *Kidney International*, in press.
2. Zhang Y, Yoshida Y, Nameta M, Xu B, Taguchi I, Ikeda T, Fujinaka H, Mohamed SM, Tsukaguchi H, Harita Y, Yaoita E, Yamamoto T. Glomerular proteins related to slit diaphragm and matrix adhesion in the foot processes are highly tyrosine phosphorylated in the normal rat kidney. *Nephrol Dial Transplant*. in press.
3. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S. Phosphorylation of Nephtrin Triggers Ca²⁺ Signaling by Recruitment and Activation of Phospholipase C- γ 1. *J Biol Chem*, 284: 8951-62, 2009
4. 張田豊:「特集-プロテオミクスが解き明かす情報伝達ネットワーク:腎糸球体上皮細胞におけるチロシンキナーゼシグナリング」 *実験医学* 羊土社, Vol. 27, 2582-2587, 2009
5. 張田豊:「腎における細胞内シグナル伝達と病態生理:細胞機能のスイッチとしての蛋白質リン酸化・脱リン酸化」腎と透析 *東京医学社*, Vol. 67, 300-305, 2009
6. 張田豊:「遺伝性ネフローゼ症候群の原因解析からみる濾過バリアとしての podocyte」 *小児内科* Vol. 41, No. 2, 252-256, 2009
7. 張田豊:「糸球体上皮細胞の新たな情報伝達分子と新機能」 *Annual Review 腎臓* 2009, 中外医学社, p1-7, 2009
8. 張田豊:「教育講演:先天性遺伝性ネフローゼ症候群の原因解析から見えてきた蛋白尿の発症機序」 *日本小児科学会学*

- 術集会 2009年4月17日、奈良
9. 張田豊 「総説:糸球体上皮細胞、その構造と機能-蛋白尿の発症原因の解明に向けて-」 *日本小児科学会雑誌* Vo.: 112, No. 8, p1219-1226, 2008

[学会発表] (計 件)

1. Harita Y: SIRP α Co-Localizes with Nephtrin at Podocyte Slit Diaphragm, and Modulates Nephtrin Tyrosine Phosphorylation. ASN(American Society of Nephrology)Renal Week 2009, San Diego, CA, 2009, 10.31.
2. Kanda S, Harita Y, et al: Phosphorylation-dependent surface expression of TRPC6 by PLC γ is negatively regulated by Nephtrin. ASN(American Society of Nephrology)Renal Week 2009, San Diego, CA, 2009, 10.30.
3. 張田 豊: 糸球体スリット膜におけるリン酸化シグナリング. 第24回新潟腎シンポジウム, 新潟, 2009, 7月25日
4. 張田 豊: Nephtrinのチロシンリン酸化は PLC γ -1を介し細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させる. 第52回日本腎臓学会学術総会 基礎と臨床の融合, 横浜, 2009, 6.26.
5. 張田 豊: 先天性遺伝性ネフローゼ症候群の原因解析から見えてきた蛋白尿の発症機序. 第112回日本小児科学会学術集会, 奈良, 2009, 4月17日
6. Kanda S, Harita Y, Sekine T, Igarashi T, Hattori S: TRPC6 as a possible link between Nephtrin and PLC γ -the role of phosphorylation of TRPC6. Renal Week 2008 2008年11月6日 フィラデルフィア
7. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S: Clustering-induced phosphorylation of Nephtrin triggers Ca²⁺ entry by recruitment and activation of PLC γ . Renal Week 2008 -2008年11月6日 フィラデルフィア
8. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S: Recruitment and activation of PLC- γ by phosphorylation of nephtrin: a new insight into a link between slit diaphragm and calcium signaling. 7th International Podocyte Meeting, 2008年6月4日 トロント
9. 張田豊: ネフローゼ症候群の病態解明への挑戦と治療の標準化-ネフローゼ症候

群発症に関連する分子群と蛋白尿発生
メカニズムー 日本小児科学会(シンポ
ジウム)、2008年4月25日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

張田豊 (HARITA YUTAKA)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究
科・特任助教

研究者番号: 10451866

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: