

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770232

研究課題名(和文) キネシン及び細胞骨格制御による腎臓発生機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of Kinesin superfamily protein
in kidney development

研究代表者

寺林 健 (TERABAYASHI TAKESHI)

熊本大学・発生医学研究所・COE リサーチ・アソシエイト

研究者番号：40452429

研究成果の概要(和文)：

本研究課題では、キネシンスーパーファミリー蛋白質の1つである Kif26b の腎臓発生における機能解析を行った。胎生期の腎臓において、Kif26b は腎臓前駆体細胞である後腎間葉にのみ発現し、*Kif26b* ノックアウトマウスは腎臓欠損という重篤な表現型を示す。Kif26b は後腎間葉の極性を制御することで、尿管芽誘引因子である GDNF の発現を制御していることが示唆された。また、腎臓形成に必須である Zn フィンガー転写調節因子 *Sall1* の標的遺伝子であることも明らかにし、腎臓発生における *Sall1*-Kif26b を軸とした分子カスケードの重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we performed the functional analysis of Kif26b, a member of kinesin super family proteins. Kif26b is expressed in the metanephric mesenchymes, a population of multipotent kidney progenitors. Disruption of *Kif26b* causes kidney agenesis because of impaired ureteric bud attraction. In the *Kif26b*-null metanephros, compact adhesion between mesenchymal cells adjacent to the ureteric buds and the polarized distribution of integrin alpha 8 were impaired, resulting in failed maintenance of Gdnf, a critical ureteric bud attractant. Overexpression of Kif26b in vitro caused increased cell adhesion through interactions with nonmuscle myosin. Thus, Kif26b is essential for kidney development because it regulates the adhesion of mesenchymal cells in contact with ureteric buds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物学科・発生生物学

キーワード：腎臓発生・キネシンスーパーファミリー蛋白質・細胞骨格・微小管・細胞接着

1. 研究開始当初の背景

腎臓は中間中胚葉から発生し、前腎、中腎、

後腎の3段階を経て形成される。前腎、中腎のほとんどは後に退行変性し、哺乳類成体に

において機能する腎臓は後腎である。後腎はネフロンと呼ばれる微小構造の集合体であり、ネフロンの形成は尿管芽と後腎間葉との相互作用から始まる。後腎間葉は液性因子である GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) を分泌し、尿管芽を引き寄せさせる。後腎間葉に侵入した尿管芽は Wnt9b を分泌し、それに反応した間葉は尿管芽の先端に凝集する。その後、凝集した間葉は自ら Wnt4 を分泌し、これが間葉自身に働いて、上皮性の管へと分化する。この管は S 字型に変化し、その上部が近位尿細管、ヘンレのループ、遠位尿細管となり尿管芽と合流する。S 字体の下部はボウマン嚢および糸球体上皮細胞(足細胞、ポドサイト)へと分化し、そこに毛細血管が入り込んで糸球体が形成される。一方、尿管芽は分岐を重ね、集合管と尿管になる。この分化プロセスが分岐した尿管芽の枝一つ一つで行われ、最終的にヒトでは 50 万-100 万個のネフロンが形成される。

Znフィンガー転写調節因子である *Sal11* は腎臓発生に必須の遺伝子である。*Sal11* の遺伝子座に GFP を挿入したトランスジェニックマウスの後腎間葉を、GFP の蛍光強度に基づいて分離し、それぞれの集団の遺伝子発現の比較を行ったところ、GFP を強く発現している細胞集団では、キネシンスーパーファミリー蛋白 (KIFs) の一員である *Kif26b* の発現が顕著に亢進していることを見出しされた。さらに *Kif26b* ノックアウトマウス (*Kif26b* $^{-/-}$) マウスを解析すると、腎臓の欠損という顕著な表現型が観察された(図 1)。これは *Kif26b* $^{-/-}$ マウスでは GDNF の発現が減少し、尿管芽の後腎間葉への侵入が不完全であることが原因であったが、後腎間葉に発現する *Kif26b* がどのように GDNF の発現を制御

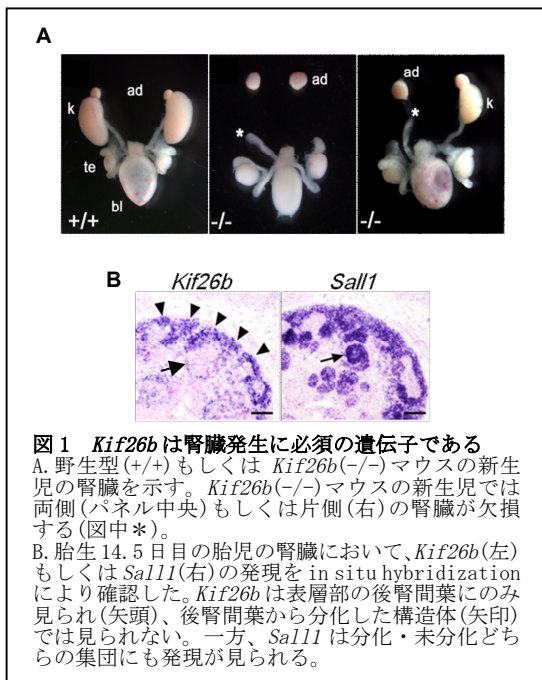


図 1 *Kif26b* は腎臓発生に必須の遺伝子である
 A. 野生型 (+/+) もしくは *Kif26b* $^{-/+}$ マウスの新生児の腎臓を示す。*Kif26b* $^{-/-}$ マウスの新生児では両側(パネル中央)もしくは片側(右)の腎臓が欠損する(図中*)。
 B. 胎生 14.5 日目の胎児の腎臓において、*Kif26b* (左) もしくは *Sal11* (右) の発現を in situ hybridization により確認した。*Kif26b* は表層部の後腎間葉にのみ見られ(矢頭)、後腎間葉から分化した構造体(矢印)では見られない。一方、*Sal11* は分化・未分化どちらの集団にも発現が見られる。

するのか、その分子機構の解明が未解決のまま残されていた。また、*Kif26b* タンパク質の機能もそれまで全く解析がなされていなかった。

2. 研究の目的

KIFs は微小管をレールとして働くモーター分子である。近年の研究により KIFs は細胞小器官やタンパク質、脂質などの多様な機能分子を輸送するだけでなく、脳の高次機能、神経回路網形成、左右の決定、腫瘍の抑制に関わることが報告されており、個体レベルでの重要性が指摘されているものの、未だ全ての KIFs の機能解析には未だ至っていない。本研究ではこれまで全く解析のなされてこなかった *Kif26b* について、分子レベルから個体レベルまで幅広く解析を行い、*Kif26b* による腎臓形成制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題は (1)*Kif26b* の分子機能の解析、(2)*Kif26b* 結合蛋白質の探索、(3)*Kif26b* の細胞機能の解析、の大きく 3 つパートに分けて解析を行った。

(1) *Kif26b* の分子機能の解析

培養細胞に FLAG タグをつけた *Kif26b* を発現させ、その局在を観察した。また、*Kif26b* がモーター活性を有するかについては、生化学的な解析を行うことで評価を行った。さらに、*Kif26b* が *Sal11* の直接のターゲットになるかについても解析を行った。

(2) *Kif26b* 結合蛋白質の探索

Kif26b がどのように GDNF の発現を制御するのか、その分子メカニズムを解明するための一助として、GST 融合蛋白質を用いた pull-down アッセイにより、*Kif26b* 結合蛋白質の探索を行った。

(3) *Kif26b* の細胞機能の解析

これまでの先行研究で、293 細胞における FLAG-*Kif26b* 発現誘導細胞株では、FLAG-*Kif26b* の発現により細胞塊を形成することを見出していた。このことは微小管モーター分子群に属する *Kif26b* が微小管細胞骨格に基づく細胞の形態変化を引き起こすことを示唆しており、*Kif26b* による GDNF の発現制御のメカニズムを紐解く重要な鍵となる可能性を秘めていると考えた。そこで、この細胞株では *Kif26b* の発現によりどのような変化が起きているのかを細胞生物学的な観点から解析を行った。

4. 研究成果

(1) *Kif26b* の分子機能の解析

HeLa 細胞に FLAG タグ付きの *Kif26b* を発現させその細胞内局在を観察したところ、FLAG-*Kif26b* は微小管と共局在することが見

出された。さらにチューブリン重合阻害剤であるノコダゾールで処理によって微小管との共局在が解消することから、Kif26bの局在は微小管によって規定されると考えられた。また *in vitro* で重合させたチューブリンを用いた共沈実験では、Kif26bは他のキネシン蛋白質と同様に、重合したチューブリンと共に沈降したことから、Kif26bは微小管と直接結合することが明らかとなった。この時、チューブリンと共沈したキネシンにATPを加えるとキネシン蛋白質はチューブリンから解離するが、Kif26bではATPを加えても解離は見られなかった。このことからKif26bはATPase活性を持たないことが示され、微小管モーター活性のないキネシンであることが強く示唆された。

Kif26bのプロモーター領域を解析したところ、転写開始点から約7.0kbp上流にSal11結合配列(ATAA[A/T][A/T]AT[A/T])がクラスターを形成していることを見出した。ビオチン化したオリゴヌクレオチドを用いたpull-downアッセイと内在性Sal11に対するChIPアッセイを行うことで、この領域にSal11が結合することが明らかになった。さらにこの領域を用いたルシフェラーゼアッセイを行うと、Sal11の発現依存的にレポーター活性が上昇し、Sal11結合配列に変異を導入したものではこの上昇が見られなかった。以上のことから、発生過程の腎臓においてSal11が*Kif26b*の発現を正に制御していることが示唆された。

(2) Kif26b 結合蛋白質の探索

N末端側にモータードメインを有するKIFはC末端側でそのカーゴと結合することが知られている。Kif26bはモーター活性を有さないと考えられるもののモータードメイン自体はN末端側に保持していることから、C末端側をGST融合蛋白質として精製し、新生児の腎臓の細胞抽出液を用いてpull-downアッセイを行った。このアッセイによる、Kif26b結

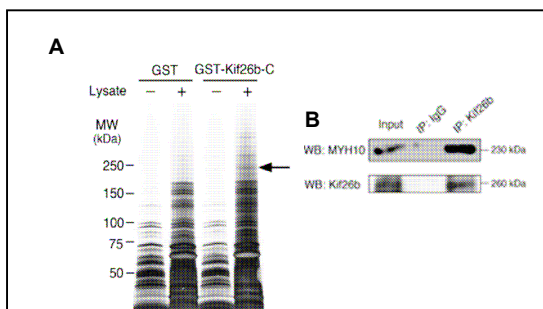


図2 Kif26b 結合蛋白質 NMHClIB の同定

A. GSTを融合したKif26bのC末端をベイトとして、マウス新生児の腎臓の細胞抽出液を用いたpull-downアッセイを行った。矢印で示すバンドは質量分析によりNMHClIBであることが示された。
B. マウス新生児の腎臓の細胞抽出液において内在性のKif26bとNMHClIBの結合を確認した。

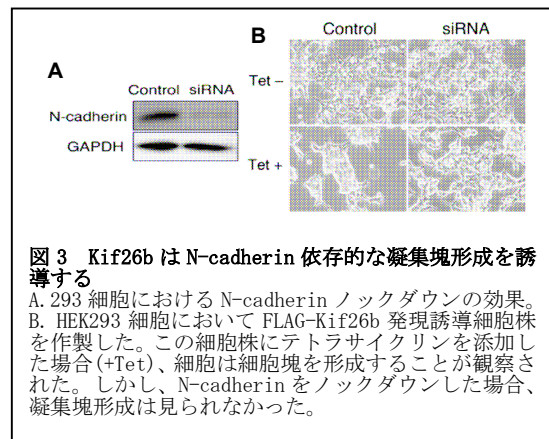


図3 Kif26bはN-cadherin依存的な凝集塊形成を誘導する

A. 293細胞におけるN-cadherinノックダウンの効果。
B. HEK293細胞においてFLAG-Kif26b発現誘導細胞株を作製した。この細胞株にテトラサイクリンを添加した場合(+Tet)、細胞は細胞塊を形成することが観察された。しかし、N-cadherinをノックダウンした場合、凝集塊形成は見られなかった。

合蛋白質としてアクチン結合蛋白質であるNMHClIB(nonmuscle myosin heavy chain type IIB)と他にいくつかの蛋白質を同定した(図2)。さらに、293もしくはHeLa細胞でFLAG-Kif26bの安定発現株を作製し、その細胞抽出液をFLAGビーズで免疫沈降することで、さらに数種類の蛋白質を結合蛋白質として同定することができた。

(3) Kif26bの細胞機能の解析

293細胞におけるFLAG-Kif26b発現誘導細胞株では、FLAG-Kif26bの発現により細胞塊を形成する。細胞塊の形成は細胞-細胞間接着の亢進によるものと考えられた。そこでディソシエーションアッセイを行ない、Ca²⁺存在もしくは非存在下での細胞塊の数の比を比較したところ、Kif26bを発現する集団では有意にこの比が高くなったことから、Kif26bによる細胞塊はCa²⁺依存的な細胞間結合により形成されていることが明らかになった。このCa²⁺依存的な細胞間結合の詳細を明らかにするために、FLAG-Kif26b発現誘導細胞株においてN-cadherinに対するsiRNAで処理しその細胞塊形成を評価したところ、N-cadherinのノックダウンにより細胞塊形成が解消されることが見出された(図3)。また、Kif26bの結合蛋白質としてNMHClIBを同定していたことから、この特異的阻害剤であるBlebbistatinで処理したところ、やはり細胞塊形成は解消された(図4)。以上のことから、

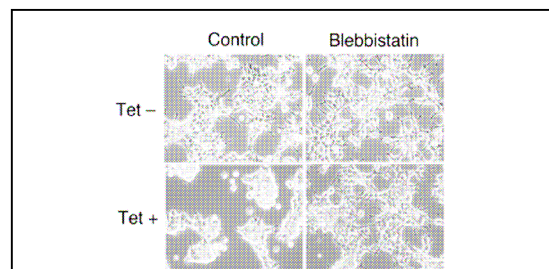


図4 Kif26bはNMHClIBを介して凝集塊形成を誘導する

HEK293細胞におけるFLAG-Kif26b発現誘導細胞株にテトラサイクリンを添加した場合(+Tet)、細胞は細胞塊を形成するが、NMHClIBの阻害剤であるBlebbistatinで処理すると、凝集塊形成は起こらなかった。

293 細胞において Kif26b は NMHCII B とともに N-cadherin 依存的な細胞間接着を亢進することが示された。

以上のことから、Kif26b は NMHCII B を介して後腎間葉の細胞間接着を制御する可能性が示唆された。野生型マウスでは、尿管芽先端に接する一列の後腎間葉細胞が凝集して上皮様の形態を示し、その側方で N-cadherin の局在が見られるが、*Kif26b* (-/-) 後腎間葉では N-cadherin の側方への局在が低下しており、この可能性を強く支持する。さらに、基底側(尿管芽側)に Integrin α 8 の発現がみられるのに対し、*Kif26b* (-/-) マウスではこのような後腎間葉細胞の凝集がみられず、Integrin α 8 の発現が低下していた。これらの結果から、Kif26b は NMHCII を介して尿管芽先端に接する後腎間葉細胞の上皮様変化を制御し、Integrin α 8 の基底側への発現を促進して尿管芽の引き寄せに必要な GDNF の発現を維持していると示唆された。

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 6 件)

- ① Funato Y., Terabayashi T., Sakamoto R., Okuzaki D., Ichise H., Nojima H., Yoshida N. and Miki H. Nucleoredoxin sustains Wnt/ β -catenin signalling by retaining a pool of inactive Dishevelled protein. *Curr. Bio.* 2010, 20, 1945-1952 査読有
- ② Uchiyama Y., Sakaguchi Y., Terabayashi T., Inenaga T., Inoue S., Kobayashi C., Oshima N., Kiyonari H., Nakagata N., Sato Y., Sekiguchi K., Miki H., Fujimura S. Tanaka S. S. and Nishinakamura R. Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 9240-9245 査読有
- ③ Hayashi T., Funato Y., Terabayashi T., Morinaka A., Sakamoto R., Ichise H., Fukuda H., Yoshida N., and Miki H. Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment of Flightless-I to Myeloid differentiation primary response gene (88). *J. Bio. Chem.* 2010, 285, 18586-18593 査読有
- ④ Yoshimura Y., Terabayashi T. and Miki H. Par1b/MARK2 phosphorylates kinesin-like motor protein GAKIN/KIF13B to regulate axon

formation. *Mol. Cell. Bio.* 2010, 30, 2206-2219 査読有

- ⑤ Terabayashi T., Funato Y., Fukuda M. and Miki H. A coated vesicle-associated kinase of 104 kDa (CVAK104) induces lysosomal degradation of Frizzled 5 (Fzd5). *J. Bio. Chem.* 2009, 284, 26716-26724 査読有
- ⑥ 寺林健、西中村隆一 腎臓の発生と再生 総合臨床 2009, Vol.58 (3) 1829-31 査読無

[学会発表] (計 5 件)

- ① Terabayashi T. and Nishinakamura R. Sall1 is involved in maintenance of nephron progenitors. The 43rd Annual Meeting for Japanese Society of Developmental Biologists, June 21, 2010, Kyoto International Conference Center, Kyoto
- ② Terabayashi T., Shuji Inoue and Nishinakamura R. Sall1 is involved in maintenance of nephron progenitors through regulation of Six2. International Symposia on "Cell Fate Regulation by Kumamoto University COE and Academia Sinica". April 9, 2010, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
- ③ Terabayashi T., Funato Y. and Miki H. A coated vesicle-associated kinase of 104 kDa induces lysosomal degradation of Frizzled 5. The American Society for Cell Biology, 49th Annual Meeting, December 7, 2009, San Diego Convention Center, San Diego, USA
- ④ Terabayashi T., Shuji Inoue and Nishinakamura R. Sall1 is involved in maintenance of nephron progenitors through regulation of Six2. International Joint Symposium on "Cell Fate Regulation Research: Stem cells and organogenesis". November 26, 2009, Kumamoto University, Kumamoto
- ⑤ Terabayashi T., Shuji Inoue and Nishinakamura R. Sall1 is essential for maintenance of nephron progenitors. GCOE mini symposium by Kumamoto University. June 1, 2009, Kumamoto University, Kumamoto

[その他]

ホームページ等

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/integrative_cell_biology/publications.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺林 健 (TERABAYASHI TAKESHI)

熊本大学・発生医学研究所・COE リサーチ・
アソシエイト

研究者番号：40452429