

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659174

研究課題名（和文） ネフリンサイクル：スリット膜タンパク質の動態の理解を通じた腎機能の維持・再生機構

研究課題名（英文） Nephrin cycle: Analyses of the dynamic state of the podocyte slit diaphragm proteins in vivo and in vitro

研究代表者

大野 茂男 (OHNO SHIGEO)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：10142027

研究成果の概要（和文）：巣状糸球体硬化症を模擬するポドサイト特異的 aPKC 変異マウスの発症原因として、Nephrin を初めとするスリット膜タンパク質の動態の異常が推測された。本研究では、この仮説を検証する目的で、Nephrin を発現させた培養上皮細胞、単離糸球体、ポドサイト特異的 aPKC 変異マウスを用いて、Nephrin の動態を調べた。その結果、Nephrin の膜移行の段階の重要性を始めて見いだした。

研究成果の概要（英文）：Previous studies on podocyte-specific aPKC KO mice that shows focal glomerular sclerosis have revealed the importance of the dynamics of Nephrin, a major slit membrane protein, for this disease. Here we evaluated the dynamics of Nephrin using epithelial cells, isolated glomerulus, and the cKO mice in vivo, and found the importance of the process of the membrane traffic in this disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：(1)細胞極性 (2)PAR3 (3) aPKC (4) podocytes (5) Nephrin

1. 研究開始当初の背景

腎臓は生命維持に大きく関わる大切な機能を果たしている臓器である。様々な腎症のうち、一部は慢性化し、最終的に慢性腎不全となり腎臓移植或いは血液透析が必要とな

る。このような患者数が増大し、医療経済の圧迫要因ともなっている。このような疾患の多くは、糸球体の機能の異常であり、巣状糸球体硬化症と総称されるが、その原因は不明である。

腎機能の要は糸球体ポドサイトのスリット膜の濾過機能にある。成体ではポドサイトは細胞分裂することはないとされ、腎機能が生涯正常に保たれる理由はポドサイトのスリット膜の維持・再生にあると考えて良い根拠が山積している。しかし、スリット膜の濾過機能の維持・再生の実態はおろか、その機構はほとんど不明といってよい。

私達は、細胞極性タンパク質 aPKC の podocyte 特異的 conditional KO mice の解析から、これが経時的に巣状糸球体硬化症を発症し最終的に死に至る事を見だし既に報告している (Hirose et al. An essential role of the universal polarity protein, aPKCλ, on the maintenance of podocyte slit diaphragms. PLoS ONE 4(1): e4194, 2009)。さらにその原因として aPKC-PAR 極性複合体がスリット膜構成タンパク質の中でも最も重要であると考えられる Nephrin に直接結合する事が関係することを示唆する結果を得ていた。

2. 研究の目的

これらの結果を踏まえ、私たちは、糸球体の機能維持の過程において、Nephrin 分子の動態が重要であると同時に、aPKC や PAR3 複合体がその制御に関わるとの仮説を立てた。本研究においては、この仮説の検証の第一段階として、Nephrin の動態を vitro と vivo で精査することを目的とした。

3. 研究の方法

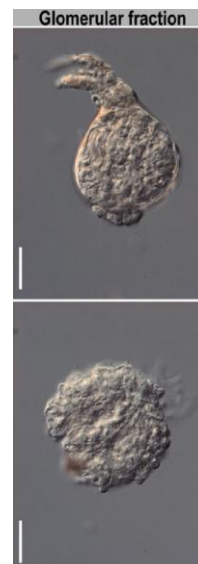
(1) Nephrin 発現上皮細胞

ポドサイトは培養が困難であり、広く用いられている細胞株では Nephrin などの発現が

極めて少なく実験が困難であることが知られている。そこで、私たちはまず上皮系細胞に Nephrin を強制的に発現した細胞株を構築し、これを第一の実験系とした。

(2) 単離ポドサイトの in vitro 培養系

強制発現系の限界は明らかであるので、私たちは、糸球体を単離し、試験管内で培養する系をもちいることにした。この系の利点は、糸球体をそのままの状態で維持する事であり、一定の時間内では、スリット膜に局在する様々なタンパク質の分布などに異常が無いことを形態学的に確認した。図に単離した糸球体を示す。



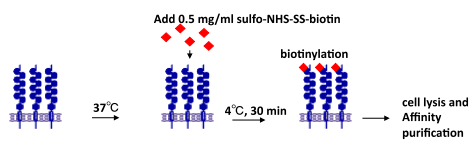
(3) 細胞表面に局在する Nephrin などのタンパク質の特異的標識

細胞表面に局在する Nephrin などのタンパク質を特異的標識した。この方法として、広く用いられている「ビオチン標識法」を用いた。

この方法により、細胞膜表層の Nephrin 分子を標識し、その合成・exocytosis・膜への発現・endocytosis・分解、という一連の過程を生化学的に解析した。

上述の二つの *in vitro* 系を用いる事に余
栄、Nephrin などのタンパク質の細胞内での
挙動を詳細に解析した。さらに、それらに耐
ス様々な薬剤の効果を調べることが可能
となった。さらに、siRNA や優性抑制性変異
体を高発現させるなどの様々な分子生物学
的抑制法を利用する事が可能となった。そ
して、これらを用いて、aPKC や PAR3 などの
関与、その他の様々なシグナル系の関与を検
討することが可能となった。

方法の概要を下図に示す。



(4) ポドサイト特異的 aPKC cKO マウス

上述した試験管内での結果を *vivo* での最
終的に検証する目的で、上述したポドサイト
特異的 aPKC cKO マウスを用いた。

その目的で、還流により *vivo* で細胞表面
の Nephrin などのタンパク質を標識し、その
後の挙動を生化学的に詳細に検討した。さら
に免疫沈降法により、Nephrin 複合体の構成
タンパク質を同定すると同時に、様々な薬剤
などによるそれらの変化を検討することによ
り、分子レベルでの挙動を解析した。

また、電子顕微鏡によるスリット膜の構造
の検討、免疫電子顕微鏡によるスリット膜タ
ンパク質の局在の検討、さらに光学顕微鏡の
進化型である STED (Stimulated emission
depletion) Microscopy を用いて、蛍光抗体
法により、Nephrin タンパク質と他のタンパ
ク質との細胞内での局在の程度を定量的に
解析する方法などを新たに開発し、それらの
細胞内での挙動を詳細に解析した。

4. 研究成果

研究成果は論文執筆中であり、学術誌に投
稿の予定であるので、ここに詳細を記載する
ことはできないが、概要を記載する。

(1) Nephrin 発現上皮細胞

上皮系細胞に Nephrin を強制的に発現した
細胞株を構築し、これを用いて、Nephrin の
細胞内動態、つまり合成、exocytosis、細胞
表面への局在化、endocytosis による細胞内
への取り込み、分解などの過程を詳細に検討
した。様々な薬剤を用いると同時に、aPKC や
PAR3 などのシグナル系分子の siRNA や優性抑
制型変異体の強制発現などの分子生物学的
な方法により、各々の過程への様々なシグナ
ル系の関与を検討した。

Nephrin 及び Podocin などのスリット膜タ
ンパク質が、予想を遙かに超える極めて早い
速度で合成され、細胞表面に局在化し、さら
に内在化し、分解されている事を示す結果を
得た。さらに、この過程に aPKC と PAR3 が大
きく関わる事を薬理的に、分子生物学的方
法で確認した。

(2) 単離ポドサイトの *in vitro* 培養系

上述の培養細胞系の弱点を補う目的で、単
離ポドサイトの培養系を確立し、これを用い
て、Nephrin の細胞内動態、つまり合成、
exocytosis、細胞表面への局在化、
endocytosis による細胞内への取り込み、分
解などの過程を詳細に検討した。さらに、
各々に対する様々な薬剤効果に関与し、様々
なシグナル系の関与を検討した。

Nephrin 及び Podocin などのスリット膜タ
ンパク質が、予想を遙かに超える極めて早い
速度で合成され、細胞表面に局在化し、さら
に内在化し、分解されている事を示す結果を

得た。さらに、この過程に aPKC と PAR3 が大きく関わる事を薬理的に確認した。

(3) ポドサイト特異的 aPKCcKO マウス

上述した試験管内での結果を vivo での最終的に検証する目的で、上述したポドサイト特異的 aPKCcKO マウスを用いて解析を行った。

還流により vivo で細胞表層の Nephtrin などのタンパク質を標識し、その後の挙動を生化学的に詳細に検討した。さらに免疫沈降法により、Nephtrin 複合体の構成タンパク質を同定すると同時に、様々な薬剤などによるそれらの変化を検討することにより、分子レベルでの挙動を解析した。

また、電子顕微鏡によるスリット膜の構造の検討、免疫電子顕微鏡によるスリット膜タンパク質の局在の検討、さらに光学顕微鏡の進化型である STED (Stimulated emission depletion) Microscopy を用いて、蛍光抗体法により、Nephtrin タンパク質と他のタンパク質との細胞内での局在の程度を定量的に解析する方法などを新たに開発し、それらの細胞内での挙動を詳細に解析した。

(4) 結論

いずれの系においても、Nephtrin 分子が極めて早い速度で exocytosis と endocytosis されている事を始めて見いだした。

さらに、この系を用いて、分子機構の解析を進め、PAR3 複合体の構成員である aPKC が、exocytosis の過程に大きく関与している事を突きとめた。これらの知見を元に、aPKC の podocyte 特異的 conditional KO mice の組織異常を詳細に解析した結果、exocytosis の異常を示す証拠を得た。

これらの結果は、糸球体の機能維持における Nephtrin の exocytosis の死活的な重要性を示すと同時に、そこプロセスに aPKC が関

わる事を示している。

これらの結果の概要は、いくつかの学会で発表した (①②)。

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 1 件)

① Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, Suzuki A, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S-I, Ohno S, Chida K: KIBRA Suppresses Apical Exocytosis through Inhibition of aPKC Kinase Activity in Epithelial Cells. *Current Biol.*, 21(8): 705-711, 2011.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=21497093>

[学会発表] (計 2 件)

① 大野茂男、上皮組織の形成と維持における極性タンパク質の役割、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、シンポジウム、細胞極性化の原理と整理機能、平成 24 年 3 月 28 日、甲府

② Satoh D, Harita Y, Daimon C, Hirose T, Kurihara H, Ohno S: Molecular mechanisms regulating the turnover of nephrin; the role of cell polarity regulator, aPKC. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011、12、14.

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~ohnos/Japanese/indexJ.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 茂男 (OHNO SHIGEO)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 10142027