

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：32629

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790293

研究課題名(和文) エンドサイトーシスレセプターの発現と機能を制御するアダプター分子の機能解析

研究課題名(英文) Regulatory molecules for expression and function of endocytic receptor

研究代表者

平野 真 (HIRANO, Makoto)

成蹊大学・理工学部・助教

研究者番号：60514172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓におけるタンパク質の再吸収はエンドサイトーシス受容体であるメガリンを中心分子として、アダプター分子による制御を受けている。本研究では新規に2種類のアダプター分子を同定した。1つはメガリンの刷子縁膜から初期エンドソームへの輸送に関与してリガンド取込みの速度を調節し、もう一方はメガリンのリサイクルリングエンドソームから刷子縁膜へのリサイクルを増加させ、リガンドの取込みを増幅させる可能性が見出された。本研究により、これまで細胞内局在や生理機能がほとんど解明されていなかった分子について、その詳細な局在情報および生理機能を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：An endocytic receptor, megalin, absorbs functionally and structurally distinct many proteins in the epithelial cells of the kidney with being regulated by adaptor proteins. In the present study, we identified two novel adaptor proteins to regulate the endocytic activity of megalin and revealed the subcellular localization and the physiological function of the adaptor proteins. Our results suggest that one regulates the rate of transportation of megalin from apical membrane to early endosome, and another regulates the recycling of megalin from recycling endosome to apical membrane in the epithelial cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞内輸送 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

メガリンは様々なタンパク質を細胞内に取り込む役割を担うエンドサイトーシスレセプターである。生体内では腎臓の近位尿細管上皮細胞のアピカル膜に大量に発現しており、糸球体を通過した低分子量タンパク質の再吸収を担う。メガリンの細胞質領域に目を向けると、シグナリングに関わる可能性のあるモチーフが多数集中している。この領域は、メガリンが膜輸送される過程で常に細胞質側を向いている。そのため、リン酸化やアダプター分子の結合等のシグナルを受容する現場となる。これまでに、エンドサイトーシスの過程において、メガリンとクラスリンとの架け橋となるアダプター分子が幾つか同定されている。しかし、エンドサイトーシスの後、メガリンがどのような経路でリサイクルされるか、どのような分子がこれを制御するか明らかにされていない。そこで、研究代表者は、メガリン細胞質領域と相互作用する分子を分離するため、メガリン細胞質領域固定化アフィニティーカラムを作製した。これにより、マウス腎臓から、メガリン相互作用分子 (アダプター分子) 候補を分離し、これまでにメガリンとの相互作用が示されていない4種類のタンパク質を質量分析で同定した。これらのうち、3種類は明確な生理機能が報告されていない分子である。

2. 研究の目的

本研究では、メガリンの細胞質領域とのタンパク質相互作用を切り口に、メガリンの細胞内輸送シグナルに焦点を当て、同定したメガリン相互作用分子候補の生理機能を解明することを目的とし、以下の4点のプロセスを掲げた。

(1) 相互作用分子候補とメガリンの相互作用

同定したメガリン細胞質領域との相互作用分子候補4種類について、メガリン細胞質領域と特異的に相互作用することを確認する。

(2) メガリンとアダプター分子の局在

相互作用が確認できたアダプター分子について、マウス腎臓切片におけるメガリンとの共局在の有無を調べる。また、これらの相互作用分子の細胞内局在が未だに明確でないため、同時に、これらアダプター分子が局在する細胞小器官を明らかにする。

(3) メガリン-アダプター分子複合体の局在

培養細胞において、メガリンとアダプター分子がどの細胞小器官で相互作用するのか明らかにする。

(4) アダプター分子の機能

メガリン発現株化細胞にて、リガンド吸収に着目し、アダプター分子の機能を明らかに

する。

3. 研究の方法

(1) 相互作用分子候補とメガリンの相互作用

ブタ近位尿細管上皮細胞株 LLC-PK1 にて、N 末端にビオチン化タグが付加されるメガリン細胞質領域を安定発現する細胞 (MegCyto/LLC-PK1) を作製した。そして、相互作用分子候補をマウス腎臓 cDNA からクローニングし、N 末端、または、C 末端に 3xFLAG タグが付加される発現ベクターを構築し、それぞれ MegCyto/LLC-PK1 に導入し、共発現細胞とした。これらの細胞の界面活性剤可溶化物をサンプルとし、ストレプトアビジンビーズを用いて共免疫沈降を行った。

(2) メガリンとアダプター分子の局在

マウス腎臓の切片および LLC-PK1 細胞において、免疫二重染色を行い、メガリンとアダプター分子の局在を検証した。また、併せて、マウス腎臓組織の密度勾配遠心分離により、アダプター分子の局在を調べた。

(3) メガリン-アダプター分子複合体の局在

2 つの分子の相互作用を可視化することが可能な *in situ* proximity ligation assay というイメージング技術を用いて、メガリン-アダプター分子複合体の LLC-PK1 細胞における細胞内局在を検証した。

(4) アダプター分子の機能

アダプター分子を発現する LLC-PK1 細胞を作製し、メガリンのリガンドの1つであるレチノール結合タンパク質を培養液に添加することで、リガンドのエンドサイトーシスに与えるアダプター分子の影響について検証した。

4. 研究成果

(1) 相互作用分子候補とメガリンの相互作用

4 種類の相互作用分子候補とメガリン細胞質領域との相互作用を共免疫沈降により、検証したところ、このうち、2 種類について、メガリンとの相互作用を示すことができた。この際、C 末端に 3xFLAG タグを導入したアダプター分子より、N 末端にタグを導入したものが、2 種類とも共沈効率が良かったことから、これらのアダプター分子は C 末端側にてメガリンの細胞質領域と相互作用することが示唆された。

(2) メガリンとアダプター分子の局在

マウス腎臓切片において、アダプター分子、メガリンの免疫染色を行ったところ、近位尿細管上皮細胞の刷子縁の付根のエンドソームが含まれるエンドサイトーシス領域と呼ばれる領域と核において、アダプター分子とメガリンとの共局在が観察された。

LLC-PK1 細胞では、核、および、初期エンドソーム、または、リサイクリングエンドソームにおける共局在が観察された。

密度勾配遠心分離を用いたマウス腎臓の細胞小器官の分画により、これらのアダプター分子は初期エンドソーム、もしくは、リサイクリングエンドソームに局在することが示された。

(3) メガリン-アダプター分子複合体の局在
in situ proximity ligation assay を用いて、LLC-PK1 細胞におけるメガリン-アダプター分子複合体の局在を検証したところ、核および初期エンドソームまたはリサイクリングエンドソームにて、複合体の存在を示す強いシグナルが観察された。

(4) アダプター分子の機能

アダプター分子のメガリンによるエンドサイトーシスに与える影響について検証するため、アダプター分子を強制発現させた LLC-PK1 細胞にて、メガリンの特異的なリガンドであるレチノール結合タンパク質の吸収を調べた。その結果、Mock に比べ、3-5 倍レチノール結合タンパク質の吸収が増大することが示された。

以上の結果から、上皮細胞において、刷子縁から初期エンドソームへのメガリンの輸送に参与し、リガンドの取込み速度を調節するアダプター分子とリサイクリングエンドソームから刷子縁へのメガリンのリサイクルを増加させ、リガンドの取込みを増幅させることが示唆されるアダプター分子を新たに同定することができた。

本研究では、メガリンのエンドサイトーシスを調節するアダプター分子を新たに同定し、これまで細胞内局在や生理機能がほとんど解明されていなかった分子について、その詳細な局在情報、および、生理機能の一端を明らかにすることができ、研究開始当初の目的は概ね達成することができた。

しかしながら、これらのアダプター分子がメガリンの細胞質領域のどのような結合モチーフと相互作用し、どのようなメカニズムでメガリンによるエンドサイトーシスを調節するのかは不明である。今後、これらの分子メカニズムを明らかにすることで、腎障害において、エンドサイトーシスの調節という新たな治療ターゲットを提示することが可能となると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

招待講演、発表者：平野真、発表標題：

腎臓における糖鎖-タンパク質相互作用の重要性、学会名：立命館大学糖鎖工学研究センター10周年記念シンポジウム、発表年月日：2014年3月14日、場所：立命館大学びわこくさつキャンパス(滋賀県)

発表者：横溝里佳、平野真、戸谷希一郎、発表標題：均一糖鎖をもつメガリンの合成研究、学会名：日本糖質学会第32回年会、発表年月日：2013年8月5-7日、場所：大阪国際交流センター(大阪府)

発表者：平野真、Bruce Y. Ma、川寄伸子、岡昌吾、川寄敏祐、発表標題：腎虚血再灌流障害における MBP-meprin 複合体形成による補体活性化、学会名：第85回日本生化学会大会、発表年月日 2012年12月16日、場所：福岡国際会議場(福岡県)

発表者：平野真、戸谷希一郎、鈴木明身、発表標題：エンドサイトーシスレセプター、メガリン上に発現する N-型糖鎖の役割、学会名：GlycoTOKYO2012、発表年月日：2012年11月17日、場所：慶応義塾大学薬学部(東京都)

発表者：平野真、戸谷希一郎、鈴木明身、発表標題：メガリン上に発現する N-型糖鎖の役割、学会名：日本糖質学会第3回年会、発表年月日：2012年9月19日、場所：鹿児島市民文化ホール(鹿児島県)

発表者：Makoto Hirano、Kiichiro Totani、and Akemi Suzuki、発表標題：Role of N-Glycans on Megalin in the Ligand-Binding Activity、学会名：International Carbohydrate Symposium (ICS2012)、発表年月日：2012年7月25日、場所：Hotel Melia Castilla(スペイン マドリード)

〔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

平野 真 (HIRANO, Makoto)
成蹊大学・理工学部・助教
研究者番号：60514172

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし