

学位論文内容の要旨

aPKC $\lambda$  maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm  
through trafficking of nephrin to the cell surface

(aPKC $\lambda$  は nephrin の細胞膜輸送制御を介し, 腎糸球体  
スリット膜の構造, 機能維持を担う)

Daisuke Satoh

佐藤 大輔

Molecular Biology

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 分子生物学

( Doctoral Supervisor : Shigeo Ohno, Professor )

( 指導教員 : 大野 茂男 教授 )

aPKC $\lambda$  maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm  
through trafficking of nephrin to the cell surface

(aPKC $\lambda$  は nephrin の細胞膜輸送制御を介し、腎糸球体  
スリット膜の構造、機能維持を担う)

1. 序論

腎臓がその血液濾過機能を発揮する上で、スリット膜と呼ばれる、腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）間に形成される濾過膜がその中心的な役割を担う (Tryggvason et al., 2006). 近年、糸球体疾患の発症に関与するスリット膜関連分子が相次いで同定されており、スリット膜の傷害が糸球体疾患に直結することが明らかとなっている。また、各種の糸球体疾患やその病態モデル動物において、nephrin を始めとするスリット膜タンパク質の細胞膜局在が減少することが報告されている。その制御を担う分子機構としてエンドサイトーシスの重要性が指摘されている。さらに、ポドサイトにおけるオートファジー、タンパク質分解系の重要性を示す知見が相次いで報告されており、スリット膜の構造、機能の維持に対する、スリット膜タンパク質の細胞膜局在制御の重要性が示唆されている。しかし、培養細胞でスリット膜を形成させる事が困難な事もあり、スリット膜タンパク質の膜局在化の動態とその分子機構の理解は大きく遅れている。

aPKC (atypical protein kinase C) は、進化的に保存された細胞極性制御タンパク質である。これまでに、aPKC は細胞間接着構造の構成タンパク質や、細胞表面受容体の膜輸送制御を介し、細胞間接着構造や細胞極性の形成、維持、各種のシグナル伝達を制御する。私達は、aPKC $\lambda$ , Par3 及び Par6 がスリット膜に局在し、その内 aPKC $\lambda$ , Par3 は nephrin と複合体を形成すること、ポドサイト特異的に aPKC $\lambda$  を欠損したマウス（以下 aPKC $\lambda$  cKO マウスと記す）は、スリット膜の構造異常に起因する重篤なタンパク尿、糸球体硬化病変を呈することより、スリット膜の構造、機能の維持に aPKC が必須の役割を果たすことを示した (Hirose et al., 2009).

これらの結果は、aPKC を中心とする細胞極性タンパク質がスリット膜タンパク質の膜局在化を介してスリット膜の維持に関わる事を示唆している。そこで、本研究では、単離した

糸球体, さらに *in vivo* におけるスリット膜タンパク質の細胞膜への局在化の動態を解析した. さらに, その制御の分子機構を解析した.

## 2. 実験材料と方法

- 1) ラットより単離した糸球体を用い, スリット膜タンパク質の細胞膜局在, エンドサイトーシス並びに分解速度を定量的に解析する手法を確立した. 単離糸球体の細胞表面をビオチン化し, 細胞膜に局在するスリット膜タンパク質をビオチンラベルした後に, ビオチン化した糸球体を 37°C で培養し, 膜輸送並びにタンパク質分解を誘起させた. 培養後, ビオチン化タンパク質を精製し, SDS-PAGE, ウェスタンブロットの手法を用い, ビオチン化スリット膜タンパク質の量について定量化し, スリット膜タンパク質の細胞膜局在並びにエンドサイトーシス, 分解速度について解析した.
- 2) ラット単離糸球体, nephrin 安定発現細胞, 並びに培養細胞の nephrin の発現誘導系に対し, aPKC の阻害剤処理, 優勢抑制変異体の高発現, ノックダウンを行った. その後上記と同様の解析を行い, nephrin の細胞膜局在並びにエンドサイトーシスに対する aPKC の関与について解析した.
- 3) 上述した aPKC $\lambda$  cKO マウス (Hirose et al., 2009) を, ビオチンを含む溶液で心灌流し, *in vivo* においてスリット膜タンパク質をビオチン化した. ビオチン化後, 腎臓を摘出して破碎し, 以降, 上記と同様の解析を行い, *in vivo* におけるスリット膜タンパク質の細胞膜局在に対する aPKC の関与について解析した. 更に, STED (stimulation emission depletion) 顕微鏡, 及び免疫電顕を用いた解析を行い, aPKC $\lambda$ -cKO マウスのポドサイトにおけるスリット膜タンパク質の局在について解析した.

## 3. 結果及び考察

### 1) スリット膜タンパク質の細胞膜局在は, その急速な代謝回転により制御される

ラット単離糸球体を用いた実験を行い, スリット膜タンパク質の細胞膜局在, エンドサイトーシス並びに分解速度について解析を行った. 糸球体単離後, 37°C, 1 時間の培養では, スリット膜タンパク質の細胞膜局在は一定に保たれており, 単離糸球体においてもスリット膜の構造が保持されていることが示された. この実験系において, 37°C, 5 分の培養により 5~7 割のビオチン化スリット膜タンパク質がエンドサイトーシスされた. 更に, 分解速度について検討したところ, 培養 30 分後にビオチン化スリット膜タンパク質 3~4 割が分解を受けたことが示された. 急速なエンドサイトーシス, 分解が起きているにも関わらず, スリット膜タンパク質の細胞膜局在は一定に保たれていたことより, スリット膜タンパク質の細胞膜局在は, その急速な代謝回転, 即ち新規合成, エキソサイトーシス, エンドサイトーシス, 分解によって制御されていることが明らかとなった.

## 2) aPKC は、エキソサイトーシス制御を介し、スリット膜タンパク質の細胞膜局在に必須の役割を果たす

次に、スリット膜タンパク質の細胞膜局在に対する aPKC の関与について解析した。単離糸球体に対する aPKC 阻害剤処理、また nephrin 安定発現細胞に対する aPKC 阻害剤処理、優勢抑制変異体高発現、及びノックダウンにより、nephrin を含むスリット膜タンパク質の細胞膜局在は顕著に減少した。一方で、nephrin 及びその他のスリット膜タンパク質の発現量は、上記の処理により変動しなかった。培養細胞における nephrin 発現誘導系を用いた実験においては、新規合成された nephrin の細胞膜への移行は、aPKC 阻害剤処理及び優勢抑制変異体高発現に伴い顕著に抑制された。一方、Nephrin のエンドサイトーシス速度は、aPKC 阻害剤処理及び優勢抑制変異体高発現により変動しなかった。以上の結果から、aPKC はエキソサイトーシス制御を介し、nephrin を始めとするスリット膜タンパク質の細胞膜局在に必須の役割を果たすことが示された。

最後に、aPKC $\lambda$  cKO マウスを用い、*in vivo*におけるスリット膜タンパク質の細胞膜局在に対する aPKC の関与について解析した。その結果、aPKC $\lambda$ -cKO マウスにおいては、コントロールマウスと比較して、スリット膜タンパク質の細胞膜局在の顕著な減少が認められた。又、aPKC $\lambda$ -cKO マウスにおいては小胞体局在型 nephrin の蓄積が認められた。また、STED 顕微鏡及び免疫電顕を用いた解析においても、aPKC $\lambda$ -cKO マウスのポドサイトにおけるスリット膜タンパク質の細胞膜局在の減少が認められた。以上より、*in vivo*においても、aPKC はエキソサイトーシス制御を介し、スリット膜タンパク質の細胞膜局在に必須の役割を果たすことが証明された。

本研究から、スリット膜の構造、機能は、スリット膜タンパク質の急速な代謝回転によって制御されていることが示された。又、aPKC はエキソサイトーシス制御を介し、スリット膜タンパク質の細胞膜局在に必須の役割を果たすことが明らかとなった。上述のように、種々の糸球体疾患においてスリット膜タンパク質の細胞膜局在が減少していることが示されており、スリット膜タンパク質の代謝回転の異常が、糸球体疾患の発症、進行と密接に関連することが想像される。現時点では不明な点が多く残されている糸球体疾患の発症、進行機序について、aPKC を始めとするスリット膜タンパク質の代謝回転制御を担う分子に着目して解析を進めていくことで、糸球体疾患の病態理解や、新規の創薬標的の発見に繋がる可能性がある。

## 4. 引用文献

Hirose, T., Satoh, D., Kurihara, H., Kusaka, C., Hirose, H., Akimoto, K., Matsusaka, T., Ichikawa, I., Noda, T. and Ohno, S. (2009). An essential role of the universal polarity protein,

aPKC $\lambda$ , on the maintenance of podocyte slit diaphragms. *PLoS One* 4, e4194.

**Tryggvason, K., Patrakka, J. and Wartiovaara, J.** (2006). Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 354, 1387-401.

## 論文目録

### I 主論文

aPKC $\lambda$  maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface

Daisuke, Satoh., Hirose, T., Harita, Y., Daimon, C., Harada, T., Kurihara, H., Yamashita, A. and Ohno, S. (2014)

The Journal of Biochemistry, in press

### II 副論文

足細胞の生化学

佐藤大輔, 廣瀬智威, 大野茂男 :

生体の科学 第63巻第3号 243頁～250頁 平成24年6月発行

### III 参考論文

- 1 An essential role of the universal polarity protein, aPKC $\lambda$ , on the maintenance of podocyte slit diaphragms.

Hirose, T., Satoh, D., Kurihara, H., Kusaka, C., Hirose, H., Akimoto, K., Matsusaka, T., Ichikawa, I., Noda, T. and Ohno, S. (2009)

PLoS One 4, e4194. doi: 10.1371/journal.pone.0004194