

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

腎糸球体上皮細胞スリット膜における蛋白質複合体の解析

指導教官 五十嵐 隆 教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成15年4月入学  
医学博士課程  
生殖・発達・加齢医学専攻  
張田 豊

腎糸球体における蛋白濾過機能に関わる遺伝子が次々と同定されている。これらの分子の多くが糸球体上皮細胞、とくにその細胞間接着装置であるスリット膜に発現する事から、スリット膜が蛋白濾過におけるバリアー機能において主要な役割を担っている事が明らかとなってきた。これらの研究の結果、稀な遺伝性のネフローゼ症候群や家族性糸球体硬化症の一部の原因が突き止められたが、小児において比較的頻度の高い腎疾患である特発性ネフローゼ症候群における蛋白尿の発症機序は依然としてその大部分が不明である。

nephrin はフィンランド型先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子(NPHS1)の遺伝子産物として同定された。この蛋白質は 8 つのグロブリンメインを持つ膜蛋白質で、ジッパー状構造のスリット膜を構成する主要因子であると考えられている。Neph1 は nephrin に類似する構造を持つ分子として同定され、nephrin と同様にスリット膜に存在する、5 つのグロブリンメインを持つ膜蛋白質である。nephrin や Neph1 の欠損マウスでは先天性ネフローゼ症候群と同様の症状を引き起こす事が知られ、Neph1 は nephrin とともにスリット膜のバリアー機能を担っていると考えられている。近年、nephrin や Neph1 が脂質ラフトと呼ばれる膜領域に複合体を形成する事、さらに nephrin が Src ファミリーチロシンキナーゼの

Fyn によりリン酸化され、このリン酸化により nephrin と Nck が結合し、この細胞特有のアクチン構造の構築に関与している事などが次々と明らかとなり、これらの分子群がシグナル複合体として働いていると考えられるようになってきた。さらに最近では、TRPC6 という糸球体上皮細胞に存在するカルシウムチャネルの変異が家族性の糸球体硬化症の原因となる事も報告されたが、TRPC6 のチャネル活性が Fyn によるチロシンリン酸化により制御されることも知られている。これらの事実から、チロシンリン酸化とスリット膜複合体の機能が密接に関係している事が示唆されている。

私は依然原因の不明なネフローゼ症候群における蛋白尿の発症機序に興味を持ち、スリット膜機能と深く関わっているスリット膜複合体におけるチロシンリン酸化の解析に取り組んだ。Neph1 のリン酸化についてはこれまでほとんど報告がなかったため、まず Neph1 が Fyn によりリン酸化されうるかどうかを調べた。Neph1 を Fyn ベクターと HEK293T 細胞に共発現すると、nephrin と同様に Neph1 のリン酸化が認められた。また、Neph1 の細胞内領域を *in vitro* で Fyn と反応させると、Neph1 がリン酸化された。さらに、Neph1 と Fyn は *in vitro* および細胞内で結合した。これらの結果から、Neph1 を Fyn の新規基質と考え、nephrin と併せてそのリン酸化の詳細を明らかにするべく、以下の実験を行った。まず、nephrin および Neph1 のリン酸化を受けるチロシン残基を決定するために、それらの細胞内領域を *in vitro* で Fyn によりリン酸化し、リン酸化した蛋白質をプロテアーゼ消化した結果できたペプチドを質量分析器で解析した。その結果、nephrin はその細胞内領域に存在する 8 つのチロシン残基すべてがリン酸化される可能性があったが、なかでも Y1204 と Y1228 に強いリン酸化の傾向が見られた。Neph1においては 3 つのリン酸化ペプチドを同定した。また、フェニルアラニン変異体を用いた実験により、Neph1 は細胞内では主に Y604, Y637, Y654 がリン酸化される事が判明した。

さらに、リン酸化 nephrin および Neph1 に結合する蛋白質を同定するために、これらの蛋白質の細胞内領域の GST 融合タンパク質を作成し、これを *in vitro* でリン酸化したもの bait とした pull-down アッセイを行い、リン酸化 nephrin に特異的に結合する蛋白質を既に報告されている Nck 以外に 5 つ(PLC-□, PI3K-p85, CrkII, CrkI, Crk-L)、また、リン酸化 Neph1 に結合する蛋白質を 2 つ(Grb2, Csk) 同定した。

Neph1 と Fyn と HEK293T 細胞内に共発現させ、免疫沈降する事により Neph1

と内在性の Grb2 との Fyn 依存的な結合が確かめられた。また、その結合は Neph1 の Y637 および Y638 のフェニルアラニン変異体では認められなくなった事から、これらのチロシン残基の Y637 の Fyn によるリン酸化が両者の結合に必須である事が判明した。Grb2 は Sos を介して Ras の活性化を触媒している事が知られているため、Neph1 を介した ERK の活性化について検討した。Neph1 のリン酸化により fyn を介した ERK の活性化が抑制され、この抑制作用は Grb2 の結合部位のリン酸化に依存していた。Neph1 の MAP キナーゼの抑制作用については AP-1 レポーターассеイでも確かめられた。これらの結果から、Neph1 のリン酸化は Grb2 の結合を介して Ras-ERK 経路に抑制的に働く事が明らかとなった。

Csk の SH2 領域と、GST-Neph1 を用いた pull down アッセイにより、Csk がその SH2 領域を介してリン酸化 Neph1 に直接結合する事が判明した。また Csk と nephrin あるいは Neph1 および Fyn を HEK293 細胞に共発現し、免疫沈降することにより、細胞内では Csk はリン酸化 nephrin とは結合しないが、リン酸化 Neph1 と結合することが明らかとなった。Csk それ自体が Src ファミリーのチロシンキナーゼであり、Fyn をリン酸化する事でこのシグナル伝達系におけるネガティブフィードバックの役割を果たしているとされている。このため、Neph1 に Csk が結合する事で、スリット膜複合体でのリン酸化反応をネガティブに制御している可能性が考えられた。

さらに Neph1 は HEK293T 細胞に単独で発現させると細胞間の接着部分に集積するが、Fyn と共に発現する事により細胞内にクラスターを形成し、発現パターンが大きく変化した。リン酸化により Neph1 の局在が制御されている事が示唆される。

また、pull-down 実験によりリン酸化 nephrin に結合する蛋白質として、Crk ファミリー蛋白質(CrkI, CrkII, Crk-L)、PI3 キナーゼ p85 及び PLC- $\square$ を同定した。Crk ファミリー蛋白質は SH2 ドメインと SH3 ドメインを持ち、種々のシグナル伝達系において蛋白質—蛋白質相互作用におけるアダプター蛋白として重要な役割を持っており、糸球体上皮細胞においても nephrin と他の分子をつなぐ働きが推察される。また、PI3 キナーゼ p85 については nephrin との結合は以前から知られていたが、今回これが Fyn によるチロシンリン酸化により制御されている事が明らかとなった。糸球体上皮細胞数の減少が糸球体硬化症の原因となる事が近年報告されており、nephrin のリン酸化を介したこの細胞における PI3 キナーゼ-Akt キナーゼ経路の生存シグナルは糸球体硬化症の発症機序の解明の觀

点からも重要な意味を持つと考えられる。

PLC-□は 2 つの SH2 領域をもつが、これらいずれもが *in vitro* でリン酸化 nephrin と直接結合した。また、PLC-□と nephrin および Fyn を HEK293T 細胞に共発現し、免疫沈降する事により細胞内においても PLC-□が nephrin とリン酸化依存的に結合する事が確かめられた。リン酸化ペプチドを用いた pull-down アッセイおよびフェニルアラニン変異体を用いた免疫沈降実験により PLC-□は nephrin の Y1204 のリン酸化依存的に結合する事が判明した。PLC-□の免疫組織染色では近位尿細管の刷子縁と糸球体では糸球体上皮細胞にその特異的な染色がみとめられ、これを新規の糸球体上皮細胞発現分子として同定した。糸球体上皮細胞の種々のマーカーとの二重染色では vimentin との共局在が認められ、正常腎では主に糸球体上皮細胞の細胞質に存在する事が明らかとなった。nephrin のリン酸化により細胞膜にリクルートされ、nephrin の下流でカルシウムシグナルを制御している可能性が示唆された。

以上の結果から Neph1 が Fyn の新規基質である事、nephrin と Neph1 のチロシンリン酸化がこれまで知られていた以上に広範囲の蛋白質間相互作用に関与している事が明らかとなり、これらの変化がスリット膜の構造、機能制御において中心的な役割を果たしている事が示唆された。スリット膜複合体の全貌を明らかにし、蛋白濾過におけるバリアー機能を解明することは、蛋白尿発症機序の解明、その根本的な治療法の発見に結びつくと期待される。