

論文内容の要旨

論文題目

家族性巣状糸球体硬化症発症機構に関する研究 —TRPC6 変異による過剰活性化メカニズムの解明—

指導教員 五十嵐隆教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

神田祥一郎

巣状糸球体硬化症(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)はネフローゼ症候群の原因の 1 つでありその 35%を占める。多くは特発性であるが、1950 年代より家族性 FSGS の存在が知られていた。長い間その原因は不明であったが、近年分子生物学的手法の進歩とともに、家族性 FSGS や先天性ネフローゼ症候群の連鎖解析が行われ Neph1、Podocin、ACTN4、CD2AP、Neph1 などの原因分子の存在が明らかとなり、これらの多くは糸球体上皮細胞(podocyte)、特にスリット膜と呼ばれる糸球体上皮細胞足突起間の細胞接着装置に存在していた。その結果スリット膜が蛋白濾過における主要な構成成分として注目されている。現在ではスリット膜は単なる接着分子としてのみならず、細胞内にシグナルを伝えるシグナル受容体であることも明らかとなり、スリット膜が様々な

シグナルの platform として働いていることも分かってきている。

スリット膜でのシグナル伝達研究の 1 つとして、チロシンリン酸化によるスリット膜の機能制御が注目されている。例えば、腎発生期やネフローゼ実験モデルで Nephin や Neph1 のチロシンリン酸化が平常時に比べ亢進し、チロシンリン酸化が細胞内シグナルを修飾し細胞骨格を変化させること、Neph1 がチロシンリン酸化を受け、アダプター蛋白 Grb2 を介し ERK 活性を制御していることが報告されている。

TRPC6(transient receptor potential C)は 6 回膜貫通型 Ca^{2+} チャネルで、血管平滑筋をはじめ多くの組織に発現していることが知られている。腎臓では podocyte のスリット膜に発現しているが、2005 年にその遺伝子異常で成人発症の家族性巣状糸球体硬化症が起こることが報告された。

培養細胞を用いて変異 TRPC6 のチャネル活性を測定したところ、いくつかの変異では活性が増大していることや、微小変化型ネフローゼや膜性腎症などの後天性ネフローゼにおいてその発現が増加していることから、podocyte における過剰な Ca シグナルが病態発症に関与することが示唆されている。

その一方これまでに FSGS において約 10 種類の TRPC6 変異が報告されているが、活性に影響を与えない変異も存在し、活性単独では病態を説明することができずその発症メカニズムは不明な部分が多い。

また in vitro の実験系により、TRPC6 が Src family tyrosine kinase によってチロシンリン酸化を受け、活性が増大することが知られている。

今回私は TRPC6 チャネルのチロシンリン酸化を介した活性化メカニズムの詳細とそのメカニズムの病態形成への関与について解明すべく解析を行った。

まず、ビオチン化実験により受容体刺激の下流において TRPC6 が Src family tyrosine kinase により細胞内のチロシンリン酸化を受け、膜発現量が増加することを見いだした。TRPC6 細胞内領域に存在するチロシンをフェニルアラニンに変えた変異体を 8 種類(Y31F, Y50F, Y85F, Y107F, Y206F, Y208F, Y284F, Y895F)作成し、HEK293T 細胞と培養 podocyte において、TRPC6 のリン酸化依存的膜移行を解析したところ、Y284F 変異の膜移行が消失することから、TRPC6 のリン酸化を介した膜移行には、N 末細胞内領域に存在する Y284 のリン酸化が関与していた。

リン酸化した Y284 に結合する蛋白質が TRPC6 の膜移行を促進する、と仮説を立て、ペプチドプルダウン実験を行った。Y284 周囲のアミノ酸からなるペプチド(リン酸化/非リン酸化)を用いて、HEK293T 細胞の cell lysate をプルダウンし銀染色を行ったところ、リン酸化 Y284 ペプチドに特異的に結合する分子量 140kD の蛋白を見出した。この蛋白をゲルから切り出し、プロテアーゼ処理を行い、作られたペプチドを質量分析計(LC-MS/MS)を用いて解析し、Y284 のリ

ン酸化に伴う結合蛋白として PLC- γ 1 を同定した。一方 si-RNA により PLC- γ 1 のノックダウンを行ったところ、リン酸化依存的な TRPC6 の膜移行が抑制され、Y284 のチロシンリン酸化と PLC- γ 1 との結合が膜移行に必須であることが分かった。

次に TRPC6 とスリット膜構成蛋白との相互作用を解析した。共免疫沈降法を行い、スリット膜の主要構成蛋白である Nephrin が TRPC6 と Y284 のリン酸化依存的に結合し、TRPC6- PLC- γ 1 結合を阻害した。つまり Nephrin は PLC- γ 1 と競合的にリン酸化 TRPC6 と結合した。GST-Nephrin-CD(cytoplasmic domain)の deletion 変異を複数作成し、これらを用いてプルダウン実験を行い、TRPC6-Nephrin 結合に必要な Nephrin 部位を 1216-1227 の 12 個のアミノ酸からなる領域と同定した。

Nephrin の TRPC6 機能への影響を解析した。ビオチン化実験では、Nephrin 存在下において TRPC6 のリン酸化依存的膜移行が減少した。また TRPC6 のチャネル活性を Ca インジケータ(Fura-2/AM)を用いて測定すると、Nephrin を共発現することによりリン酸化 TRPC6 を介した Ca 流入が抑制された。以上より、Nephrin は PLC- γ 1 と競合的に TRPC6 に結合することで TRPC6 のリン酸化依存的膜発現およびチャネル活性化に対し、抑制的に働くことが分かった。

TRPC6 との結合に必要な Nephrin の細胞内領域を同定したが(Nephrin(1216-1227))、Cell-penetrating peptide を用いた方法でこの領域のペプチドを HEK293T 細胞および培養 podocyte の細胞内に導入したところ、この Nephrin ペプチド(1216-1227)は TRPC6-PLC- γ 1 複合体の膜発現および channel 活性を抑制する効果を持っていた。

報告されている TRPC6 の患者変異についても同様に Nephrin との結合を解析した。解析した 6 つの変異の内 5 つにおいて Nephrin との結合が低下していた。また患者変異 TRPC6 の機能に対する Nephrin の影響を調べると、全ての患者変異で Nephrin による抑制を受けず膜発現およびチャネル活性が増大していた。以上より TRPC6 のリン酸化を介した活性化は促進的な PLC- γ 1 と抑制的な Nephrin によって制御され、患者変異では Nephrin による抑制制御が減弱し、TRPC6 機能が亢進していることが明らかになった。この結果は糸球体上皮細胞特異的なチャネルの制御機構の存在を意味し、一般的な培養細胞でのチャネル活性測定単独では明らかにならなかった病態発症メカニズムを説明するものである。多くのネフローゼ症候群において Nephrin の発現が低下しており、これらの病態で Nephrin のチャネル活性抑制への抵抗性がこの細胞における Ca ホメオスタシスを変化させていると考えられた。また Nephrin ペプチド(1216-1227)は TRPC6 機能を抑制することから、podocyte 内に導入する適切な方法があれば新たな治療法となりうる可能性が示唆された(Pat. Pend.)。