

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業））
分担研究報告書

腎尿細管における低分子蛋白再吸収分子機構の解明

研究分担者 張田 豊 東京大学医学部附属病院小児科講師

研究要旨

糸球体で濾過された低分子蛋白は、近位尿細管において cubilin-amnionless (CUBAM) 複合体によってエンドサイトーシスの機構で再吸収されるが、複合体の膜輸送や糖鎖修飾の異常に関する詳細は検討されていない。Imerslund-Gräsbeck 症候群 (IGS) は CUBAM 複合体の構成分子である cubilin (CUBN) あるいは amnionless (AMN) の変異によって起こり、近位尿細管及び腸管上皮における内因子-ビタミン B12 複合体を含む低分子蛋白の再吸収障害を呈する。今回新たに同定した新規 CUBN 変異を含め、これまでに報告されている AMN および CUBN 変異の解析により CUBAM 複合体の細胞膜輸送の分子機構を明らかにした。腎尿細管および腸管上非における低分子蛋白のエンドサイトーシスの分子機構が明らかになった。

A. 研究目的

糸球体で濾過された低分子蛋白は、近位尿細管において cubilin-*amnionless* (CUBAM) 複合体によってエンドサイトーシスの機構で再吸収される。これらの分子の異常が低分子蛋白の再吸収障害をきたす機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

Imerslund-Gräsbeck 症候群 (IGS) は近位尿細管及び腸管上皮における内因子-ビタミン B12 複合体を含む低分子蛋白の再吸収障害を呈する疾患であり、cubilin 遺伝子 (CUBN) あるいは *amnionless* 遺伝子 (AMN) の変異により発症する。2 歳時に巨赤芽球性貧血 (ビタミン B12 吸収不全) と診断され、5 歳時に蛋白尿を指摘され 6 歳時に腎生検を施行された男児において (腎生検結果は正常組織所見)、エクソーム解析およびサンガーシークエンスによる遺伝子解析を施行した。また、培養細胞を用いて膜発現量およびエンドサイトーシス量の定量評価し、さらに cubilin の糖鎖修飾を解析した。糖鎖修飾部位の同定のために SILAC (stable isotope labeling using amino acids in cell culture) 法を用いた。

C. 研究結果

IGS 患児において CUBN のヘテロのミスセンス変異 c.1957G>C (p.Gly653Arg) を検出した。新規変異であり、両親の解析から *de novo* と考えられた。

次に腎生検組織標本を用いて、*amnionless* および cubilin の染色を行った。正常近位尿細管ではこれらの蛋白は刷子縁に存在するが、患児においては *amnionless* と cubilin の局在が細胞質内へと変化しており、

CUBAM 複合体の細胞膜輸送障害が示唆された。

次に、培養細胞を用いて cubilin と *amnionless* の膜発現量およびエンドサイトーシス量を定量化し、患者変異による影響を検討した。*amnionless* は cubilin と共依存的に細胞膜表面上に輸送されるが、患者 CUBN 変異は両者の膜発現および複合体のエンドサイトーシスを著明に低下させた。さらに cubilin は *amnionless* と共発現することにより特異な糖鎖修飾が起こるが患者 CUBN 変異によりその変化が阻害されることを見いだした。これらの変化はこれまでに報告されている一部の CUBN 変異およびすべての AMN ミスセンス変異でも同様の結果が得られた。SILAC 法を用い *amnionless* 依存的な cubilin 分子の糖鎖修飾部位を同定した。一方で cubilin と *amnionless* の結合は Gly653Arg 変異により変化は見られず、蛋白複合体の結合自体は糖鎖修飾および細胞膜発現の十分条件ではなかった。細胞に糖鎖修飾阻害薬を添加することにより *amnionless* 依存的 cubilin 膜移行が阻害されたことから、糖鎖修飾こそが膜輸送に必要であることが示唆された。糖鎖修飾不全変異体を用いた解析により cubilin 分子の CUB ドメインにおける複数の糖鎖修飾が小胞体からゴルジ体への移行を可能とし、CUBAM 複合体の細胞膜発現に必要であることが明らかになった。

D. 考察

今回 IGS で見いだした新規 CUBN 変異および既報の CUBN および AMN のミスセンス変異を解析し、変異が cubilin の糖鎖修飾を阻害し、その結果 CUBAM の細胞膜輸送を阻害す

る事を見いだした。尿細管における低分子蛋白の再吸収機構に関する理解が深まった。

E. 結論

IGS 症例の解析により、近位尿細管における低分子蛋白の再吸収には CUBAM 複合体の翻訳後修飾及び細胞膜輸送が必須である事を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito K, Shiino T, Kurihara H, Harita Y, Hattori S, Ohta Y. Afadin regulates RhoA/Rho-associated protein kinase signaling to control formation of actin stress fibers in kidney podocytes. *Cytoskeleton* 72:146-56, 2015
- 2) Matsunaga A, Harita Y, Shibagaki Y, Shimizu N, Shibuya K, Ono H, Kato H, Sekine T, Sakamoto N, Igarashi T, Hattori S. Identification of 4-Trimethylaminobutyraldehyde Dehydrogenase (TMABA-DH) as a Candidate Serum Autoantibody Target for Kawasaki Disease. *PLoS One*. 10(5):e0128189, 2015
- 3) Konomoto T, Imamura H, Orita M, Tanaka E, Moritake H, Sato Y, Fujimoto S, Harita Y, Hisano S, Yoshiura KI, Nunoi H. Clinical and histological findings of autosomal dominant renal-limited disease with LMX1B mutation. *Nephrology*. doi: 10.1111/nep.12666, 2015
- 4) 張田豊：特発性ネフローゼ症候群の発症機序．日本小児腎臓病学会誌 28:

120-128, 2015

- 5) 張田豊：スリット膜関連分子と細胞内骨格調節 腎と透析 78: 364-368, 2015
- 6) 張田豊：蛋白尿．小児疾患診療のための病態生理 小児内科 47 増:474-478, 2015

2. 学会発表

- 1) 張田豊：特発性ネフローゼ症候群の発症機序 日本小児腎臓病学会 神戸 2015 年 6 月 18-20 日
- 2) 張田豊：蛋白尿はなぜ出るのか？－ネフローゼ症候群の血中因子と遺伝的素因－ 第 7 回千葉小児腎フォーラム 浦安市 2015 年 10 月 15 日
- 3) Udagawa T, Miura K, Saito A, Harita Y. Defect of interdependent membrane targeting and endocytosis of cubilin and amnionless leads to Imerslund-Gräsbeck syndrome Renal Week 2015, San Diego, USA, Nov. 5-8, 2015
- 4) 宇田川智宏、三浦健一郎、鶴見晴子、加藤元博、斎藤亮彦、三井純、大出晃司、張田豊 Cubilin と Amnionless の共依存的膜輸送障害は Imerslund-Grasbeck 症候群の原因となる。第 6 回分子腎臓フォーラム 大阪 2015 年 9 月 5 日
- 5) 張田豊、北中幸子、磯島豪、芦田明、服部元史 LMX1B 関連腎症の実態調査による疾患概念の確立 日本小児腎臓病学会 神戸 2015 年 6 月 18-20 日
- 6) 安藤 友久, 張田 豊, 森田 進, 信田 りの, 磯島 豪, 安戸 裕貴, 三浦 健一郎, 北中 幸子, 岡 明 広範な腹壁

- 腫脹で発症した Acute Hemorrhagic Edema の一例 日本小児科学会学術集会 大阪 2015年4月17-19日
- 7) 張田豊、北中幸子、磯島豪、芦田明、服部元史 *LMX1B* 関連腎症の実態調査 日本腎臓学会学術集会 名古屋 2015年6月5-7日
- 8) Tsurumi H, Harita Y, Kurihara H, Miura K, Hattori M, Oka A. Alteration of mesangial cell-cell junction in glomerulonephritis is associated with directional migration. Asian Society of Pediatric Research, 大阪 2015年4月15-17日
- 9) 鶴見 晴子, 栗原 秀剛, 三浦 健一郎, 服部 元史, 張田 豊 メサンギウム細胞接着構造は極性形成に必要であり細胞運動性を制御する 日本腎臓学会学術集会 名古屋 2015年6月5-7日
- 10) 宇田川 智宏, 三浦 健一郎, 鶴見 晴子, 斎藤 亮彦, 張田 豊 新規 Cubilin 遺伝子変異解析による近位尿細管再吸収メカニズムの解明 日本腎臓学会学術集会 名古屋 2015年6月5-7日
- 11) 宇田川 智宏, 三浦 健一郎, 鶴見 晴子, 加藤 元博, 張田 豊 Imerslund-Grasbeck 症候群の解析による尿細管再吸収分子機構の解明 日本小児腎臓病学会学術集会 神戸 2015年6月18-20日
- 12) 滝澤 慶一, 張田 豊, 三浦 健一郎, 松本 幸男, 古谷 憲孝, 岡 明, 西本 創, 高見澤 勝 ネフローゼ症候群、急性腎障害を呈したループス腎炎の4歳女児例 日本小児腎臓病学会学術集会 神戸 2015年6月18-20日
- 13) 鶴見 晴子, 栗原 秀剛, 三浦 健一郎, 五十嵐 隆, 岡 明, 服部 元史, 張田 豊 メサンギウム細胞接着の分子構造とメサンギウム増殖性腎炎におけるその変化および意義 日本小児腎臓病学会学術集会 神戸 2015年6月18-20日
- 14) 苗代 有鈴, 神田 祥一郎, 金子 直人, 藪内 智朗, 多田 憲正, 菅原 典子, 宮井 貴之, 石塚 喜世伸, 近本 裕子, 秋岡 祐子, 世川 修, 三浦 健一郎, 張田 豊, 近藤 秀治, 香美 祥二, 服部 元史 巨大臍嚢胞を認めた繊毛病の1例 日本小児腎臓病学会学術集会 神戸 2015年6月18-20日
- 15) 中田 智大, 石田 良, 藤井 敦子, 三原 悠, 富田 彩, 草場 哲郎, 磯島 豪, 張田 豊, 北中 幸子, 玉垣 圭一 巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)治療中に *LMX1B* 遺伝子変異を同定した1例 日本腎臓学会西部学術集会 金沢 2015年10月23-24日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし