

2022年3月31日

一般財団法人 日本産業科学研究所
理事長 宮地 尚殿

下記の通り、一般財団法人日本産業科学研究所研究助成金の研究実績を報告致します。

順天堂大学大学院医学研究科
老人性疾患病態・治療研究センター
佐々木和教

令和3年度研究助成実績報告書

研究課題名：細胞極性複合体に基づく腎疾患の発症機構の解明と予防治療の開発

研究背景および目的

多くの上皮細胞では、細胞間接着によって細胞膜が仕切られ、タンパク質をはじめとする生体内の構成成分が細胞内で非対称に分布し、細胞極性が確立されている。この細胞極性の崩壊は、個々の上皮細胞の機能に異常をもたらし、各器官が果たす生理機能に対して障害を与える。このような細胞極性の異常を要因の一つとする疾患に、腎臓のネフローゼ症候群がある。近年、低分子量 G タンパク質 Rap1 の活性化と細胞間接着部位への局在が腎臓の血液ろ過機能に関与し、この Rap1 調節の異常がネフローゼ症候群の発症に関連することが分かってきた。これまでに我々は、細胞極性を制御する中心的なタンパク質キナーゼ atypical protein kinase C (aPKC) のプロテオミクス解析から、Rap1 に関連する因子として Shank2(Sasaki et al., Cell Reports 2020)と p200 を見出している。これら aPKC 結合タンパク質の解析を通じて、Rap1 の活性と局在を統御する分子機構を明らかにすることで、ネフローゼ症候群に対する新たな予防治療の戦略策定や疾患発症のバイオマーカー開発が期待できる。そこで本研究では、新たに見出した aPKC 結合タンパク質 p200 に着目し、細胞極性と Rap1 調節における p200 の機能を明らかにすることを目的とした。

研究成果

細胞極性の分子メカニズムを明らかにするため、これまでに細胞極性キナーゼ aPKC に結合するタンパク質の網羅的な探索を進めてきた。精製タグを付加した aPKC を培養細胞に発現させ、タグを用いて精製し、この精製標品に含まれる aPKC 結合タンパク質を質量分析で同定した。その結果、Rap1 の調節に関連する p200 を新たに見つけることに成功した。本研究では aPKC と p200 の複合体形成を確認するため、HEK293T 細胞と発現コンストラクトを用いた結合実験を行った。まず HA タグ付きの aPKC 野生型と FLAG-SBP タグ付きの p200 野生型を HEK293T 細胞に発現させ、その細胞抽出液から p200 を SBP タグで精製した。SBP タグでの精製画分に対して抗 HA 抗体を用いてイムノブロットを行ったところ、HA-aPKC を検出した。さらに、p200 の欠失変異体を用いた結合実験から、HA-aPKC の共沈降が認められる欠失変異体を検出し、

p200 のどこに aPKC が結合するかを特定した。これらの結果より、p200 と aPKC が確かに複合体を作ることを確認した。

次に p200 の機能を類推するために、p200 が上皮細胞のどこに局在するかを検証した。FLAG-SBP タグを付加した p200 をイヌ腎上皮 MDCK 細胞に発現させ、SBP、aPKC、タイトジャンクションのマーカーZO-1 に対する抗体で共免疫染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。その結果、p200 は MDCK 細胞の細胞間接着部位に aPKC 及び ZO-1 と共局在することが分かった。この結果は、p200 が細胞間接着の調節に関与する可能性を示唆する。

研究の意義および展望

近年のノックアウトマウスを用いた解析から、ネフローゼ症候群の分子メカニズムの理解が進み、低分子量 G タンパク質 Rap1 の活性化と局在化機構の異常が病態の発症・進展に関連することが分かってきた。これまでに我々は、足場タンパク質 Shank2 が N 末端の SPN ドメインを通じて活性化 Rap1 を細胞間接着部位に局在化させるという Rap1 の局在制御メカニズムを明らかにしている (Sasaki et al., Cell Rep. 2020)。そして本研究から、Rap1 に関連することが知られている p200 が aPKC に結合し、上皮細胞の細胞間接着部位にて aPKC と共局在することが分かった。現在、p200 の遺伝子改変をした上皮細胞の解析を進めており、p200 が Rap1 をどのように調節し、上皮細胞の細胞間接着を制御するかを検証している。先行研究から、腎臓において aPKC や Shank2、p200 をノックアウトしたマウスは、Rap1 のノックアウトマウスと似たような表現型を示し、ネフローゼ症候群様の表現型を呈する。そのため、aPKC-p200 複合体の解析を進め、分子間相互作用のネットワークが Rap1 をどのように調節するかを解明することで、ネフローゼ症候群の発症機構の解明とそれに基づいた新たな予防治療につながることを期待される。

研究業績

1. Itai T, Hamanaka K, **Sasaki K**, Wagner M, Kotzaeridou U, Brösse I, Ries M, Kobayashi Y, Tohyama J, Kato M, Ong WP, Chew HB, Rethanavelu K, Ranza E, Blanc X, Uchiyama Y, Tsuchida N, Fujita A, Azuma Y, Koshimizu E, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Takahashi H, Miyagi E, Tsurusaki Y, Doi H, Taguri M, Antonarakis SE, Nakashima M, Saitsu H, Miyatake S, Matsumoto N*: De novo variants in CELF2 that disrupt the nuclear localization signal cause developmental and epileptic encephalopathy. *Human Mut*: 42,66-76, 2021.

2. Miyatake S, Kato M, Kumamoto T, Hirose T, Koshimizu E, Matsui T, Takeuchi H, Doi H, Hamada K, Nakashima M, **Sasaki K**, Yamashita A, Takata A, Hamanaka K, Satoh M, Miyama T, Sonoda Y, Sasazuki M, Torisu H, Hara T, Sakai Y, Noguchi Y, Miura M, Nishimura Y, Nakamura K, Asai H, Hinokuma N, Miya F, Tsunoda T, Togawa M, Ikeda Y, Kimura N, Amemiya K, Horino A, Fukuoka M, Ikeda H, Merhav G, Ekhilevitch N, Miura M, Mizuguchi T, Miyake N, Suzuki A, Ohga S, Saitsu H, Takahashi H, Tanaka F, Ogata K, Ohtaka-Maruyama C, Matsumoto N*: De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria. *Sci Adv* 7, eabd2368, 2021.

3. Motomura H, Ozaki A, Tamori S, Onaga C, Nozaki Y, Waki Y, Takasawa R, Yoshizawa K, Mano Y, Sato T, **Sasaki K**, Ishiguro H, Miyagi Y, Nagashima Y, Yamamoto K, Sato K, Hanawa T, Tanuma S, Ohno S, Akimoto K*: Glyoxalase 1 and protein kinase C λ as potential therapeutic targets for late-stage breast cancer. *Oncol Lett* 22, 547, 2021.
4. Motomura H, Tamori S, Yatani M, Namiki A, Onaga C, Ozaki A, Takasawa R, Mano Y, Sato T, Hara Y, Sato K, Yuyun X, Harada Y, Hanawa T, Tanuma S, **Sasaki K**, Ohno S, Akimoto K*: GLO 1 and PKC λ regulate ALDH1-positive breast cancer stem cell survival. *Anticancer Res*, 41, 5959-5971, 2021.
5. Sakamoto M, **Sasaki K**, Sugie A, Nitta Y, Kimura T, Gürsoy S, Cinleti T, Iai M, Sengoku T, Ogata K, Suzuki A, Okamoto N, Iwama K, Tsuchida N, Uchiyama Y, Koshimizu E, Fujita A, Hamanaka K, Miyatake S, Mizuguchi T, Taguri M, Ito S, Takahashi H, Miyake N*, Matsumoto N*. De novo ARF3 variants cause neurodevelopmental disorder with brain abnormality. *Hum Mol Genet.* 31, 69-84, 2022.