

## 第8回研究奨励賞受賞報告

濱 野 翔

杏林大学医学部小児科学教室

今回の杏林医学会研究奨励賞の受賞対象論文である、Association of crumbs homolog-2 with mTORC1 in developing podocyte. PLoS one. ; 13 (8) : e202400. Doi : 10.1371.2018は上皮細胞の極性決定因子の一つであるCrumbs homolog-2の腎臓発生過程における局在およびCRB2リン酸化のmTORC1経路への影響を報告したものです。ポドサイトは糸球体濾過障壁の最外層に位置する高度に分化した上皮細胞ですが、その分化に至る機序は未解明です。上皮細胞の機能には極性形成が重要ですが、その極性決定因子の一つにCrumbsがあり、哺乳類ではCrumbs homolog-1, 2, 3が同定されています<sup>1)</sup>。そのうちCrumbs homolog-2 (CRB2) は腎臓糸球体と網膜上皮細胞に特異的に発現しています<sup>2)</sup>。近年、CRB2ノックアウトゼブラフィッシュではポドサイト形成不全が惹起されることや<sup>3)</sup>、CRB2に遺伝子変異を有するステロイド抵抗性ネフローゼ症候群が報告されましたが<sup>4)</sup>、その病態は不明でした。一方、蛋白合成促進系であるmTORC1経路を抑制しているTSC1をポドサイト特異的にノックアウトしたマウスではmTORC1経路が亢進し、ポドサイト障害、蛋白尿が出現することが知られています<sup>5)</sup>。さらに腸管上皮細胞において、CRB2の相同体であるCRB3が蛋白複合体を形成するPals1, PATJを介してmTORC1経路を抑制することが報告されました<sup>6)</sup>。そこで我々は糸球体特異的に発現しているCRB2の腎臓発生過程における局在解析とmTORC1活性調節への影響を検討することとしました。まず抗リン酸化CRB2抗体、HEK-293細胞とMDCK細胞を用いた野生型CRB2およびチロシンリン酸化部位欠失型CRB2の安定発現細胞株を作成しました。これらの発現細胞株を用いて、CRB2のタンパク特性(分子量、細胞内局在、糖鎖修飾の意義)と、さらにmTORC1活性に与えるCRB2チロシンリン酸化の影響を検討しました。また、新生仔マウス腎を用いて、各分化過程の糸球体におけるCRB2、チロシンリン酸化CRB2、リン酸化mTORの発現パターン

を検討しました。その結果、CRB2は約200 kDaの1回膜貫通N型糖蛋白であり、かつN-型糖鎖の存在はCRB2自身の細胞膜集合に必須であることが分かりました。極性を保持するMDCK細胞でのCRB2の局在は、細胞膜側面に観察されました。腎臓の発生段階におけるポドサイト内での局在は、CRB2はS-shape期のポドサイト前駆細胞の頭頂側部に強く発現し、Capillary loop期では細胞側面から基底側へ移動していました。成熟期では係蹄壁パターンとして観察され、その発現強度は維持されていました。一方、リン酸化CRB2は、局在パターンはCRB2と同様でありましたが、S-shape期で弱く、Capillary loop期以降で強く観察されました。また、リン酸化mTORはリン酸化CRB2と同様のパターンで観察されました。最後に、細胞株を用いたアミノ酸枯渇アッセイから、CRB2のチロシンリン酸化の欠失は、細胞内のエネルギー枯渇に対するmTORC1経路の感受性を鈍化させることが分かりました。本研究の結果より以下の知見が得られました。①CRB2の細胞膜集合にN結合型糖鎖修飾が必須であること。②ポドサイトの発生に伴い、CRB2は局在・発現強度を変えていくこと。③CRB2は、発生段階のポドサイトでmTORC1との共局在が見られ、そのリン酸化がmTORC1活性調節に関わっている可能性があること。以上の知見よりCRB2は極性形成以外に自身のリン酸化を介してmTORC1経路を調節し、ポドサイトの発生・分化に寄与している可能性が考えられました。今後の課題としてCRB2リン酸化を調節する上流分子とシグナル伝達経路を明らかにする必要があると考えます。

## 謝辞

本受賞論文作成にあたり、ご指導ご協力頂きました小児科 楊國昌教授ならびに小児科学教室、薬理学教室、解剖学教室の先生方やスタッフの方々に深謝申し上げます。またご選考頂きました選考委員の先生方、杏林医学会の先生方、

事務局の方々に心より御礼申し上げます。

#### 文献

- 1) Gosens I, den Hollander AI, Cremers FP, et al. Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina. *Exp Eye Res.* 2008 ; 86 : 713-26.
- 2) Van den Hurk A, Rashbass R, Davis J, et al. Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Mol Vis* 2005 ; 11 : 263-73
- 3) Ebarasi L, He L, Hultenby K, et al. A reverse genetic screen in the zebrafish identifies crb2b as a regulator of the glomerular filtration barrier. *Dev Biol.* 2009 ; 334 : 1-9.
- 4) Ebarasi L, Ashraf S, Bierzynska A, et al. Defects of CRB2 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet.* 2015 ; 96 : 153-61.
- 5) Inoki K, Mori H, Wang J, et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest.* 2011 ; 121 : 2181-96.
- 6) Massey-Harroche D, Delgrossi MH, Lane-Guermonprez L, et al. Evidence for a molecular link between the tuberous sclerosis complex and the Crumbs complex. *Hum Mol Genet.* 2007 ; 16 : 529-36.