

腎糸球体スリット膜に関連した膜タンパク質の網羅的解析の試み： ラットポドサイトにおける PECAM-1 の発現

瀧 本 裕 基

新潟大学大学院医歯学総合研究科
腎研究センター 腎構造病理学分野
(主任：河内 裕教授)

Comprehensive Analysis of Slit Diaphragm-related Proteins in the Rat Kidney: Novel expression of PECAM-1 in rat podocytes

Hiroki TAKIMOTO

*Department of Structural Pathology, Kidney Research Center,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director : Prof. Hiroshi KAWACHI)*

要 旨

腎糸球体の基底膜を覆っているポドサイト（糸球体上皮細胞）は、スリット膜と呼ばれる特徴的な細胞間接着を形成している。この構造は、血漿タンパク質を保持するための最終的かつ本質的な障壁として機能し、ポドサイトの機能を調節するシグナル伝達の場合としての役割も果たす。したがって、スリット膜に発現しているタンパク質の網羅的な解析はポドサイトの特性を理解するうえで重要であると考えられる。

本研究では、抗原を中心に 200-300nm 以内のタンパク質を fluorescein で標識し解析する Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources 法を用いて、スリット膜近傍のタンパク質の網羅的な解析を試みた。

その結果、ラットの単離糸球体からスリット膜関連タンパク質を濃縮して抽出することに成功し、ラットのポドサイトにおいて Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 が発現していることを新たに見出すことができた。本研究で得られた成果は今後のポドサイト研究における重要なリソースになると期待される。

キーワード：ポドサイト、スリット膜、Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS)、質量分析、Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1)

Reprint requests to: Hiroki TAKIMOTO
Department of Structural Pathology,
Kidney Research Center, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒 951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
腎研究センター 腎構造病理学分野

瀧 本 裕 基

緒 言

腎糸球体の糸球壁は、内皮細胞、糸球体基底膜、およびポドサイトの3つの層からなる。この障壁は水や中小分子を自由に通過させる一方で、血清アルブミンやそれより大きなタンパク質の通過は高度に制限される。なかでも、ポドサイトの主要な細胞間接着装置であるスリット膜は血漿タンパク質の漏出を防ぐために重要な機能を果たし、スリット膜の異常はタンパク尿を伴う糸球体疾患の病態に関与する¹⁾。1988年にOrikasaらは、スリット膜を認識するマウスモノクローナル抗体(5-1-6抗体)をラットに静脈内投与すると大量のタンパク尿を引き起こすことを報告し²⁾、スリット膜が糸球体濾過障壁において必須の構造であることを示した。後に、Tophamらによって5-1-6抗体はスリット膜の重要な構成分子であるnephrin^{3) 4)}の細胞外ドメインを認識する抗体であることが示された⁵⁾。今日に至るまで多くの研究者がスリット膜を構成する分子の解明に取り組み、podocin^{6) 7)}やKin of IRRE-like protein 1^{8) 9)}などスリット膜を構成している様々な分子が発見されてきた。また、最近の研究ではスリット膜は濾過障壁としての機能だけでなく、細胞骨格の調節や極性の維持など様々な機能に関わるシグナル伝達の拠点としての役割を果たすことが示されている¹⁰⁾⁻¹²⁾。こうしたことから、スリット膜近傍に発現しているタンパク質の解析はポドサイトの研究において重要なリソースとなると考えられる。

質量分析装置を用いて糸球体またはポドサイトのプロテオーム解析を行った結果がいくつか報告されている¹³⁾⁻¹⁶⁾。しかし、これらの報告ではスリット膜に関連して発現している、細胞全体として発現量の低いタンパク質に関しては検出できていない可能性がある。このような分子も含めて同定するためには、スリット膜近傍のタンパク質を選択的に抽出して解析する方法が理想的である。さらに、すでに報告されているポドサイトのプロテオーム研究のなかにはスリット膜のマーカーともいえるnephrinが同定されていない、あるいはごくわずかな量しか検出されていないものが

あり^{13) 14)}、実験手技がポドサイトの細胞間接着を解離させるなど、生理的状态を反映していない可能性があることにも留意しなければならない。

近年、Horseradish peroxidase (HRP) による反応を利用して aryl azide-biotin や fluorescein-conjugated tyramide (FT) といった試薬を活性ラジカル種に変換させて HRP の近傍 200 ~ 300nm の分子を蛍光標識する Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) とよばれる手法が Kotani らによって確立された^{17) 18)}。そこで、本研究ではこの方法を用いて生体内でスリット膜近傍に発現するタンパク質の抽出を試みた。我々は、先に述べた 5-1-6 抗体を用いてスリット膜の nephrin を HRP によって標識し、さらに FT を反応させ、スリット膜近傍に発現するタンパク質を網羅的に fluorescein 標識させた後、抗 fluorescein 抗体による免疫沈降を行った。その結果、本方法によって nephrin, podocin, Kin of IRRE-like protein 1 などのスリット膜に局在するタンパク質が選択的に抽出されていることが確認でき、ラットのポドサイトにおいて Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) が発現していることを新たに見出すことができたので報告する。

材料と方法

1. 実験動物

8 ~ 10 週齢のオスの Wistar ラットを用いて後述する腎糸球体単離、免疫蛍光抗体法による組織染色を行った。本論文における動物実験は、動物実験倫理委員会により審査され、新潟大学学長より承認された動物実験計画に沿って実施した(承認番号「27 新大研第 415 号 3」)。

2. 抗体

nephrin の細胞外領域を認識する 5-1-6 抗体は河内 裕教授(新潟大学腎研究センター・分子病態学分野)から提供を受けた。また、ネガティブコントロールとして抗 Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) 抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用

いた。EMARS 反応の結果 fluorescein 標識されたタンパク質の免疫沈降には抗 fluorescein ヤギポリクローナル抗体 (Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA, USA) を用いた。抗 PECAM-1 抗体、抗 laminin 抗体、抗 nephrin 抗体はそれぞれ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Sigma-Aldrich, Immuno-Biological Laboratories (Fujioka, Gunma, Japan) から購入した。

3. 糸球体単離

磁気ビーズでラット腎を灌流し、細切した皮質をコラゲナーゼ消化後、100 μ m のメッシュを通し、磁力を利用して糸球体を単離した。この方法は当教室で発表した方法に準じたが¹⁹⁾、コラゲナーゼでの消化時間を 30 分に短縮した。

4. HRP による nephrin の標識と EMARS 反応

ラット 12 匹から単離した糸球体を 2 等分し、5-1-6 抗体もしくは抗 KLH 抗体を 1 次抗体としてそれぞれに加えて 20℃ で 60 分反応させた。各抗体の濃度は 1 μ g/ml となるよう FN-PBS (2% FBS, 0.1% sodium azide を含む PBS) で希釈して使用した。抗 KLH 抗体は、HRP による標識とは無関係に糸球体の内在性のペルオキシダーゼによって EMARS 反応が起こり、fluorescein 標識される分子が生じる可能性を考慮して、ネガティブコントロールとして使用した。1 次抗体との反応終了後、FN-PBS で 5 回洗浄し、HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗体 (Immuno-Biological Laboratories) を 2 次抗体として加えて 20℃ で 30 分反応させた。FN-PBS で 2 回、N-PBS (0.1% sodium azide を含む PBS) で 3 回洗浄した後、FT 反応液を加えて 20℃ で 20 分反応させ、EMARS 反応による fluorescein 標識を行った。N-PBS での洗浄を行った後、上清を取り除き -20℃ で保存した。

5. EMARS 反応により標識されたタンパク質の精製

細胞膜タンパク質を濃縮する目的で、可溶性のタンパク質の除去を行った。5-1-6 抗体を用いて HRP 標識を行い、EMARS 反応によって

fluorescein 標識を行ったサンプル (“5-1-6 抗体群”), KLH 抗体を用いて同様の処理を行ったサンプル (“KLH 抗体群”) に FOCUS global fractionation kit (G-Biosciences, St. Louis, MO, USA) の Soluble Protein Extraction (SPE) buffer を加えて超音波処理により懸濁し、4℃, 140,000 g, 60 分間の超遠心 (CP-80 β , Hitachi Koki, Tokyo, Japan) を行った。可溶性タンパク質を含む上清を取り除いた後、再度 SPE buffer を加えて超音波処理・超遠心を繰り返して沈殿物を回収した。

さらに、未反応の FT を除去するため沈殿物をクロロホルム・メタノール混合液 (2:1) 500 μ l で洗浄後、さらに 50% メタノールで洗浄した。洗浄した沈殿を遠心濃縮機 (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いて乾燥後、100 μ l の 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) を加えて懸濁し、95℃ で 10 分間加熱することで可溶化し、400 μ l の NP-40 lysis buffer (1% NP-40, 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.4, 5mM EDTA-2Na, 1% glycerol) で希釈した。

次いで抗 fluorescein 抗体を用いた免疫沈降を行った。抗 fluorescein 抗体を Zeba spin column (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて脱塩処理後、Dynabeads M-270 Epoxy (Thermo Fisher Scientific) と、メーカー指定のプロトコールに従ってカップリングさせた。この beads にサンプルを加え、4℃ で終夜反応させて免疫沈降を行った (1mg の beads に対して約 30 μ g の抗 fluorescein 抗体を反応させ、1 回の免疫沈降では 5-1-6 抗体群、KLH 抗体群のそれぞれのサンプルに対して beads の重量として 1mg に相当する量を用いた)。免疫沈降後の上清は破棄せずに新たな抗体 beads と反応させて免疫沈降を計 5 回繰り返した。免疫沈降後の beads は、NP-40 lysis buffer 500 μ l で 5 回、0.5M NaCl を添加した PBS で 2 回、脱イオン水で 1 回洗浄した後 SDS sample buffer (2% SDS, 10 % glycerol, 62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% 2-mercaptoethanol) 30 μ l を加えて 50℃ で 15 分加熱することで fluorescein 標識されたタンパク質を溶出させた。こ

のようにして得られたタンパク質のサンプルは還元条件下で SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) を行い, Typhoon 9400 (GE Healthcare, Tokyo, Japan) により fluorescein 標識されたタンパク質を確認した後に Coomassie Brilliant Blue R250 染色を行った。

6. 糸球体からの膜分画の調製

EMARS 法の有用性を検討するため, 可溶性のタンパク質を除去した糸球体サンプル (膜分画) を調製した。つまり, 単離した糸球体に対して EMARS 反応を行わず, 「5. EMARS 反応により標識されたタンパク質の精製」の項で述べた方法と同様に超遠心を 2 回繰り返して可溶性のタンパク質を除去した膜分画を調製した (ここでは, 磁気ビーズを用いて腎を灌流した後 sieving 法²⁰⁾と同様にして得られた単離糸球体を PBS に浮遊させ, 磁力を利用してより選択的に回収するという方法で糸球体単離を行っており, コラゲナーゼによる消化は行っていない)。超遠心後の沈殿は脱イオン水 500 μ l で洗浄した後, SDS sample buffer 30 μ l を加えて 50°C で 15 分加熱してタンパク質を可溶化させた。タンパク質の濃度は, デオキシコール酸ナトリウムとトリクロロ酢酸を用いてタンパク質を沈殿させた後, Lowry 法によって測定した²¹⁾。この中から 20 μ g のタンパク質を使用して EMARS 反応産物と同様の条件で SDS-PAGE を行った。

7. トリプシンによるゲル内消化と質量分析

EMARS 反応産物と EMARS 法による標識を行わない糸球体膜分画は SDS-PAGE で分離後, Coomassie Brilliant Blue R250 で染色し, それぞれの試料のレーンを等間隔でスライスし, dithiothreitol と iodoacetamide による還元アルキル化後トリプシンによるゲル内消化を行った²²⁾。また, 後述する抗 PECAM-1 抗体を用いた免疫沈降の後に SDS-PAGE を行ったゲルについても, ウェスタンブロットのバンドとマーカータンパクの位置を参照して目的とする位置のゲルを切り出して同様にゲル内消化を行った。EMARS 反

応産物は 1 ~ 4 回目の免疫沈降によって得られたサンプルのレーンを使用し, 同一の分子量範囲のゲルスライスをすべて回収してゲル内消化を行った。抽出したペプチドは 0.3% 乙酸 15 μ l に溶解し, nano-flow LC (Eksigent nanoLC 415 with ekspert cHiPLC, Sciex, Foster, CA, USA) - tandem mass spectrometer (TripleTOF5600+, Sciex) を用いてそれぞれのサンプルを 2 回測定した。タンパク質の同定は Mascot search engine (Matrix Science, London, U.K.) を用い, UniProt の rat proteome database (2015-08 release) に対して検索した。False Discovery Rate (FDR) は 1% 以下に設定し, スコア (MudPIT scoring) が “Identity threshold” を超えるペプチドのみを対象とした。また, データベースの特定のタンパク質のアミノ酸配列に有意に帰属する MS/MS スペクトルの総数とそのタンパク質の濃度に依存するという原理に基づいて定量値を算出するスペクトラル・カウンティング法を用いて, 同定タンパク質の定量的な指標を算出した²³⁾。EMARS 反応産物の “5-1-6 抗体群” と “KLH 抗体群” の比較においては, 等量のタンパク質 (糸球体) から調製されたサンプルを定量性が維持されるような方法で同定を行っているため, モル濃度に対応する Spectral Abundance Factor (SAF) を用いた。一方, 糸球体の EMARS 反応産物 と EMARS 反応を行っていない膜分画との比較では, タンパク質量が明らかに異なるサンプルの比較となることから, 相対モル濃度に対応する Normalized Spectral Abundance Factor (NSAF) を用いた²³⁾。

8. ウェスタンブロット

EMARS 法で標識しない糸球体膜分画を調製した場合と同様に, コラゲナーゼによる消化を行わずに単離した糸球体に RIPA buffer (150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 7.4) を加えて超音波処理により懸濁・破碎し, 氷上に 30 分静置した後に 20,000g で 30 分遠心して上清を回収した。Lowry 法によるタンパク質量後, 10 μ g のタンパク質を使用して還元条件下で SDS-PAGE

を行い, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した. PVDF 膜は 0.05% Tween20 を含む PBS で希釈した 5% スキムミルクでブロッキングを行い, 1 次抗体と 4℃ で終夜反応させ, 0.05% Tween20 を含む PBS で洗浄してから 2 次抗体と反応させた. 1 次抗体は抗 PECAM-1 抗体, もしくはネガティブコントロールとして抗 KLH 抗体を用い (共に濃度は 0.4μg/ml), 2 次抗体は goat anti-mouse immunoglobulin conjugated with peroxidase-labeled dextrane polymer (mouseEnVision; DAKO, Carpinteria, CA, USA) を 1000 倍希釈で使用した.

9. 抗 PECAM-1 抗体を用いた免疫沈降

抗 PECAM-1 抗体の特異性を確認するため, ウェスタンブロットで用いたのと同じ糸球体の lysate から抗 PECAM-1 抗体による免疫沈降を行い, 回収されたタンパク質のサンプルを SDS-PAGE で分離後, 抗 PECAM-1 抗体を用いたウェスタンブロットで反応する部分のゲルを切り出し, ゲル内トリプシン消化後, 質量分析装置によって解析した. 免疫沈降は SureBeads Protein G Magnetic Beads (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて, 免疫沈降はメーカー指定のプロトコールに従った. 免疫沈降物の半分をウェスタンブロットに使用し, 残り半分を SDS-PAGE で分離して質量分析装置によるタンパク質同定に用いた.

10. 組織染色

3μm の厚さのラットの凍結腎切片を作製し, 免疫蛍光染色 (間接法) を行った. 凍結切片を 2% パラホルムアルデヒド / PBS で 10 分間固定し, PBS で洗浄した後, 一次抗体と共に 4℃ で終夜反応させた. 一次抗体としてはマウスモノクローナル抗 PECAM-1 抗体 (4μg/ml) およびウサギ抗 laminin 抗体 (5μg/ml) またはウサギ抗 nephrin 抗体 (5μg/ml) を予め混合したものを用いた. 続いて PBS で洗浄した後, fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG (Immuno-Biological Laboratory) および tetramethylrhodamine isothiocyanate-conjugated anti-rabbit IgG (SouthernBiotech,

Birmingham, AL, USA) を加えて室温で 1 時間反応させ, PBS で洗浄した. また, 核染色には DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) を用いた. 組織標本はレーザー走査共焦点顕微鏡 (A1Rsi; Nikon, Tokyo, Japan) を用いて観察した.

結 果

1. EMARS 反応による fluorescein 標識

単離糸球体が EMARS 反応により fluorescein 標識されているかを蛍光顕微鏡で確認した (図 1). “5-1-6 抗体群” では糸球体表面に沿った明確な染色像がみられたのに対して “KLH 抗体群” では糸球体内の弱い蛍光のみであり, 非特異的な標識であると考えられた. さらに, これまでの報告では糸球体単離の手技により足突起の一部が基底膜から脱落することが電子顕微鏡による観察によって示されており²⁴⁾, 本研究においても EMARS 反応が終了した時点での糸球体を電子顕微鏡により観察した. その結果, 足突起の基底膜からの脱落は部分的に認められたもののスリット膜を含む糸球体係蹄壁の構造は概ね保たれており, 足突起の退縮は認めなかった.

2. EMARS 反応産物の電気泳動解析

EMARS 反応で fluorescein 標識し, 抗 fluorescein 抗体を用いた免疫沈降により回収されたタンパク質を SDS-PAGE で分離し, フラットベッド蛍光イメージスキャナー (Typhoon 9400) で蛍光を検出した. 5-1-6 群のサンプルでは fluorescein 標識されたタンパク質のバンドを確認でき (図 2 A), KLH 群のサンプルと比較して明らかな差を認めた. また, 今回の実験条件では蛍光標識された EMARS 反応産物は 4 回目の免疫沈降までは回収できていたが, 5 回目の免疫沈降ではほとんど回収されていなかった. 続いて同じゲルを用いて Coomassie Brilliant Blue R250 染色を行ったが, 蛍光シグナルとは異なり “5-1-6 抗体群” と “KLH 抗体群” とで明らかな差は認めず, 免疫沈降後のタンパク質が微量であることを示していた (図 2 B).

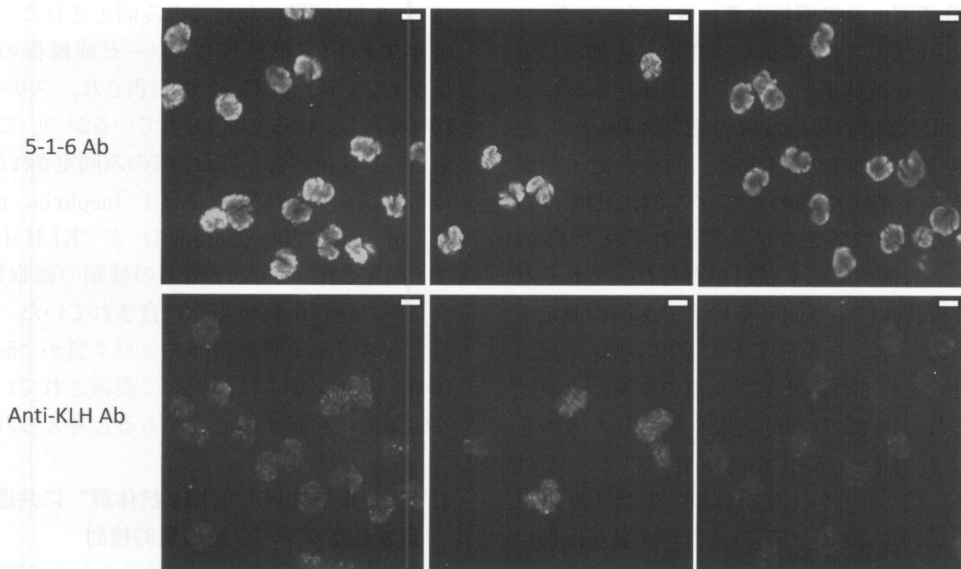


図1 EMARS 反応により fluorescein 標識したラット糸球体の顕微鏡画像

上段：5-1-6 抗体で処理した糸球体 下段：抗 KLH 抗体で処理した糸球体

5-1-6 抗体で処理した糸球体は、実験ごとに蛍光強度の強弱はあったものの、KLH 抗体で処理したものと比較して糸球体の表面に沿ったより強い蛍光染色を認めた.

Scale bar = 100 μ m.

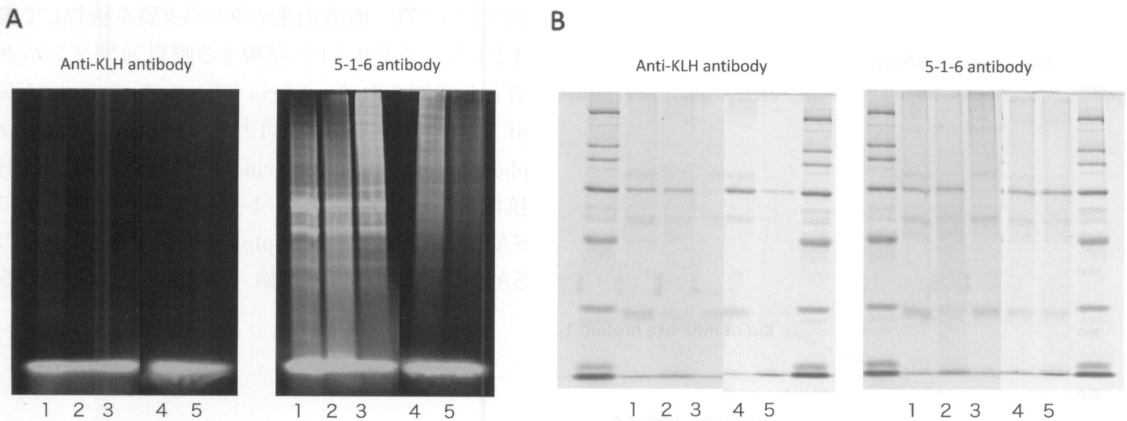


図2 EMARS 反応産物の電気泳動像

1 回目から 5 回目の免疫沈降で得られたタンパク質を左から順番に使用している. 左が “KLH 抗体群”, 右が “5-1-6 抗体群” のサンプル.

(A) 抗 fluorescein 抗体による免疫沈降により得られた EMARS 反応産物の蛍光シグナル解析. 蛍光標識されたタンパク質は “5-1-6 抗体群” で明らかに多く回収されている.

(B) Coomassie Brilliant Blue 染色の結果. 高分子量の領域では “5-1-6 抗体群” の方でわずかにタンパク質が多いように見られたが, 両群の間の明らかな差は指摘できなかった.

3. 質量分析データの解析とデータマイニング

EMARS 反応産物のタンパク質電気泳動の結果から, “5-1-6 抗体群” および “KLH 抗体群” について, 4 回目までの免疫沈降の電気泳動レーンを 11 のゲルスライスに切り分け, 同一の分子量範囲にあるスライスを合わせてゲル内消化を行った. この方法では各サンプル群それぞれで 11 のトリプシン消化ペプチド試料が得られ, それぞれを質量分析装置により同一条件下で 2 回の測定を行ったため, サンプル群ごとに 22 の測定結果が得られた. それぞれのサンプル群のタンパク質同定は, これらの 22 の測定結果を統合したものを使用して行った. “5-1-6 抗体群” においては 562 のタンパク質, “KLH 抗体群” では 400 のタンパク質が同定され, 257 のタンパク質が両群に共通して同定された.

ポドサイトの細胞接着分子である Junctional adhesion molecule A²⁵⁾, Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog²⁶⁾, スリット膜に局在しバリア機能の維持に関与する Ephrin B1²⁷⁾ およびスリット膜より頂端部に局在するシアル化膜貫通型タンパク質である podocalyxin^{28) 29)} は

“5-1-6 抗体群” においてのみ同定された. さらに, 近年ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の原因遺伝子として新たに Crb2 が報告され, スリット膜近傍に発現していると考えられているが³⁰⁾, この分子も “5-1-6 抗体群” においてのみ同定された.

しかし, スリット膜関連分子 (nephrin, podocin, Kin of IRRE-like protein 1) が “KLH 抗体群” でも同定され, さらにかなりの種類の細胞質タンパク質が “5-1-6 抗体群” に含まれていた. したがって, スリット膜近傍のタンパク質が “5-1-6 抗体群” のサンプルに選択的に濃縮されているのかを定量的に検証する必要があると考えられた.

4. “5-1-6 抗体群” “KLH 抗体群” に共通して同定されたタンパク質の量的検討

各サンプル群で共通に同定された 257 個のタンパク質それぞれについて, モル濃度に比例する定量的な指標である SAF を算出した. また, 各サンプル群での SAF の値の比 (5-1-6 抗体群 / KLH 抗体群) の分布を Tukey の Box plot (box-and-whisker plot) で示した (図3). すでに報告されているポドサイト細胞膜貫通型タンパク質, 細胞内タンパク質, 血液由来のタンパク質を抜粋して表1とした. ポドサイトに発現する膜貫通型タンパク質として知られる nephrin^{3) 4)}, podocin^{6) 7)}, Kin of IRRE-like protein 1^{8) 9)}, protein tyrosine phosphatase, receptor type O³¹⁾ に関しては “KLH 抗体群” と比較して “5-1-6 抗体群” で明らかに SAF の値が高く, Box plot で確認するとこれらの SAF の比はすべて外れ値 (outlier) となっている

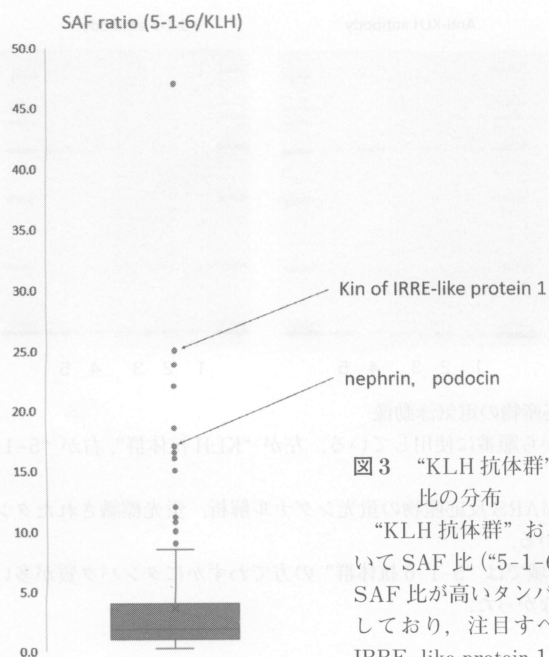


図3 “KLH 抗体群”, “5-1-6 抗体群” の両方で同定されたタンパク質の SAF 比の分布

“KLH 抗体群” および “5-1-6 抗体群” の両方で同定されたタンパク質について SAF 比 (“5-1-6 抗体群” / “KLH 抗体群”) の分布を箱ひげ図で示している. SAF 比が高いタンパク質は “5-1-6 抗体群” において濃縮されていることを示しており, 注目すべきことにスリット膜関連タンパク質 (nephrin, Kin of IRRE-like protein 1, podocin) は際立って高値 (outlier) であった.

のがわかる。さらに、SAF の値の比で最も高値となった Thrombospondin type I domain-containing 7A は近年になって成人特発性膜性腎症の病因に
関与し³²⁾、ポドサイトのスリット膜近傍に発現
することが明らかにされた分子である³³⁾。これ
に対して、細胞内タンパク質、血液由来タンパク
質の SAF 比は明らかに低値であった。

5. 糸球体膜分画同定タンパク質との比較

EMARS 法を行わず可溶性タンパク質を除去し
たのみのサンプル（膜分画）との比較を行い、ス
リット膜近傍のタンパク質が“5-1-6 抗体群”に
より選択的に抽出できているかを検証した。両サ
ンプルで、ポドサイト、メサングウム細胞および
内皮細胞に報告されている膜タンパク質を相対的
なモル濃度比に比例すると考えられる NSAF 値

表1 “KLH 抗体群”，“5-1-6 抗体群” の両方で同定されたタンパク質の SAF 比

由来	タンパク質名	遺伝子名	SAF (5-1-6抗体群)	SAF (KLH抗体群)	SAF比 (5-1-6/KLH)
細胞膜	Thrombospondin type 1 domain-containing 7A	Thsd7a	2.86E-02	6.09E-04	47.0
	Kin of IRRE-like protein 1	Kirrel (Neph1)	3.28E-02	1.31E-03	25.0
	Integrin beta-1	Itgb1	1.49E-01	6.27E-03	23.8
	Nephrin	Nphs1	1.93E-01	1.12E-02	17.3
	Protein tyrosine phosphatase, receptor type O	Ptpro	2.80E-02	1.64E-03	17.0
	Podocin	Nphs2	1.78E-01	1.04E-02	17.0
細胞内	Desmin	Des	2.00E-01	1.07E-01	1.9
	Vimentin	Vim	8.61E-01	4.83E-01	1.8
血液由来	Serum albumin	Alb	4.42E-01	3.73E-01	1.2
	Hemoglobin subunit alpha-1/2	Hba1	2.75E-01	2.32E-01	1.2
	Hemoglobin subunit beta-1	Hbb	6.67E-01	6.60E-01	1.0

“KLH 抗体群” および “5-1-6 抗体群” の両方で同定されたタンパク質について各群での SAF 値を計算し、SAF
比（“5-1-6 抗体群” / “KLH 抗体群”）を算出した（図3 参照）。nephrin や Kin of IRRE-like protein 1 などのスリ
ット膜関連タンパク質やその周辺に発現するタンパク質は “5-1-6 抗体群” で多く同定されている一方で、desmin や
vimentin などの中間径フィラメントやアルブミンなどのタンパク質は同じ程度に検出されている。

表2 ポドサイト、メサングウム細胞、および内皮細胞の代表的なタンパク質に関する NSAF 値の比較

局在	タンパク質名	NSAF (5-1-6抗体群)	NSAF (膜分画)	NSAF比 (5-1-6/膜分画)	
ポドサイト	スリット膜関連	Nephrin	4.60E-03	3.83E-04	12.0
		Kin of IRRE-like protein 1	7.81E-04	2.59E-04	3.0
		Junctional adhesion molecule A	3.18E-04	2.85E-04	1.1
		Podocin	4.23E-03	3.79E-03	1.1
	基底側	Epherin B1	6.90E-05	4.57E-04	0.2
		Integrin beta-1	3.55E-03	3.40E-03	1.0
		CD151 antigen	3.76E-04	4.67E-04	0.8
		Integrin alpha-3	1.58E-03	2.57E-03	0.6
	頂端側	Protein tyrosine phosphatase, receptor type O	6.66E-04	4.86E-05	13.7
		Podocalyxin	3.07E-04	1.47E-03	0.2
メサングウム細胞	Platelet-derived growth factor receptor beta	2.17E-05	3.59E-05	0.6	
	Thy-1 membrane glycoprotein	—	5.47E-03	—	
内皮細胞	Platelet endothelial cell adhesion molecule	5.27E-04	1.16E-04	4.5	
	Intercellular adhesion molecule 2	1.72E-04	7.83E-04	0.2	
	Intercellular adhesion molecule 1	—	9.64E-05	—	
	CD34 antigen	—	2.89E-04	—	

EMARS 反応を行わず可溶性タンパク質を除去したのみの膜分画のサンプルと比較して “5-1-6 抗体群” のサンプ
ルでは nephrin、Kin of IRRE-like protein 1 といったスリット膜関連タンパク質の値は高値、メサングウム細胞、内
皮細胞のマーカーとされるタンパク質の NSAF 値は低値を示す傾向にある。

を計算して比較した(表2)。

“5-1-6 抗体群”は、スリット膜関連タンパク質では、Ephrin B1を除き、膜分画とほぼ同じか高値を示していた。メサンギウム細胞および内皮細胞に報告されているタンパク質では、PECAM-1を除き、検出されないか膜分画より低値を示した。

PECAM-1が“5-1-6 抗体群”で明らかに高値であったことについては、これまでに報告されている分布を考慮すると合理的な説明が困難であり、ポドサイトにおけるPECAM-1の発現の検証を行った。

6. 抗 PECAM-1 抗体の検証と糸球体における PECAM-1 の局在

ラット糸球体で発現している PECAM-1 の分子量を明らかにし、本研究で使用した抗 PECAM-1 抗体の特異性を確認する目的でウェスタンブロットを行った。PECAM-1 は一般には 130kDa の糖タンパク質として報告されているが³⁴⁾、我々の実験では 85 および 110kDa の位置にバンドが検出された(図4A)。抗 KLH 抗体をネガティブコントロールとして用いた同様の実験ではバンドは検出されなかった。

このため EMARS 反応産物の MS 解析の結果

を再度検討したところ、PECAM-1 は主に約 75kDa ~ 110kDa の分子量領域に対応するゲルからそれぞれ検出されており、ウェスタンブロットの結果と矛盾しない結果であった。130kDa 以外の位置に PECAM-1 のバンドがみられている文献³⁵⁾もあり、種々の variant が存在する可能性がある。

糸球体の lysate から抗 PECAM-1 抗体で免疫沈降を行い、得られたタンパク質のウェスタンブロットを抗 PECAM-1 抗体で染色すると、これらの 85kDa および 110kDa のタンパク質を確認できた。また、抗 KLH 抗体を用いた免疫沈降ではこれらのタンパク質は回収されなかった(図4B)。

次に、抗 KLH 抗体または抗 PECAM-1 抗体による免疫沈降のレーンの 85kDa および 110kDa のバンドの位置に対応するゲル片、すなわち 4 つのゲル片を切り出して質量分析装置による解析を行った。PECAM-1 は、抗 PECAM-1 抗体による免疫沈降の 110 k Da に対応するゲル片においてのみ同定されており、85kDa に対応するゲル片からはタンパク質の量が少ないためか、検出されなかった。また、抗 PECAM-1 抗体による免疫沈降では N 末端から 3 番目の Ig ドメインを除く各細胞外ドメインから 7 つの PECAM-1 にユニークなペプ

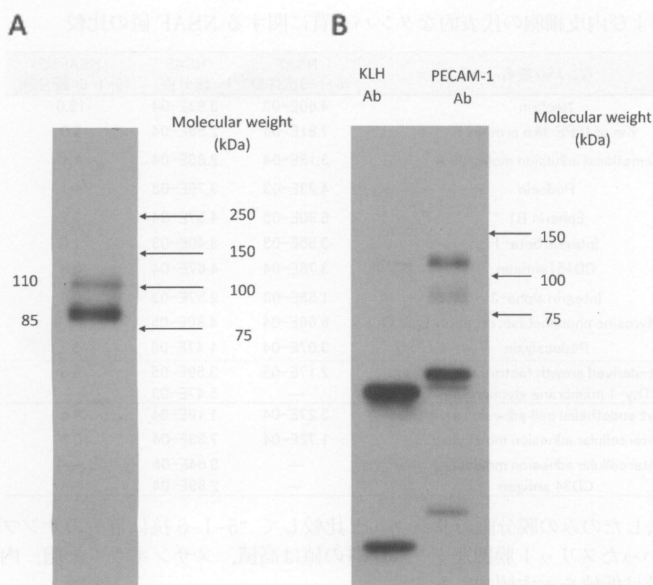


図4 抗 PECAM-1 抗体を用いたウェスタンブロット

- (A) ラットの単離糸球体の lysate を用いてウェスタンブロットを行ったところ、分子量 85kDa、110kDa の位置にバンドを認めた。
- (B) ラットの単離糸球体の lysate と抗 PECAM-1 抗体または抗 KLH 抗体によって免疫沈降を行い、回収されたタンパク質を用いてウェスタンブロットを行い、抗 PECAM-1 抗体を反応させた。110kDa および 85kDa のバンドは抗 PECAM-1 抗体を用いた免疫沈降において検出された。75kDa 未満のバンドは、抗マウス IgG 検出システムと交差反応した抗 KLH 抗体および抗 PECAM-1 抗体を表している。

チドが検出された (図 5)。このように抗体の特異性を確認した抗 PECAM-1 抗体を用いて免疫染色を行った。糸球体内での局在を明らかにするため、糸球体基底膜のマーカーとして laminin およびポドサイトのマーカーとして nephrin に対する抗体を用いた二重蛍光抗体法を行った。

PECAM-1 はラット腎において糸球体外の血管では内皮細胞に特異的に染色されていたが、糸球体内については PECAM-1 の発現は糸球体基

底膜の外側の細胞で認められ、ポドサイトのマーカーである nephrin と局在が一致しておりポドサイトに特異的であった (図 6)。

また、マウスおよびヒトの腎組織についても免疫蛍光染色を行っているが (ヒトの正常腎臓組織は、腎癌のため摘出された腎から得た)、これらの生物種に関しては糸球体の内皮細胞で PECAM-1 の発現を認めるもののポドサイトにおいては認められなかった。

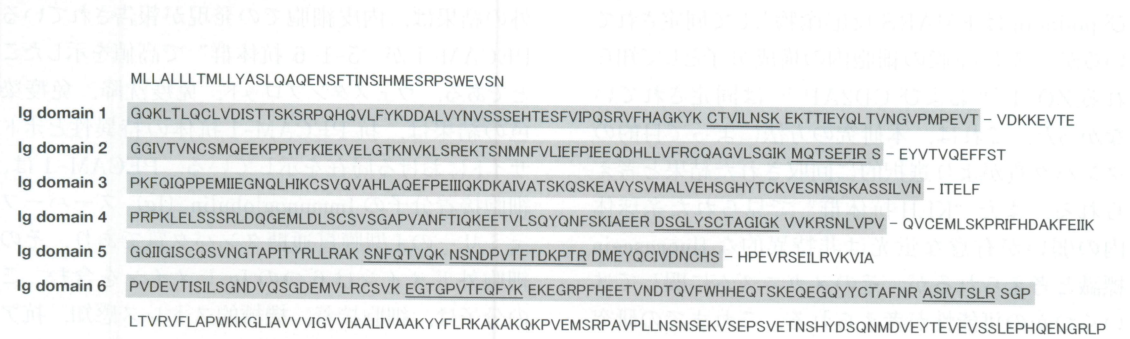


図 5 ラット PECAM-1 のアミノ酸配列. (accession number : Q3SWT0)

各 Ig ドメインに対応する配列は背景を灰色にして示している。下線が引かれた配列は、抗 PECAM-1 抗体による免疫沈降で 110kDa に対応するゲル片から質量分析装置を用いた解析で同定された配列を示している。

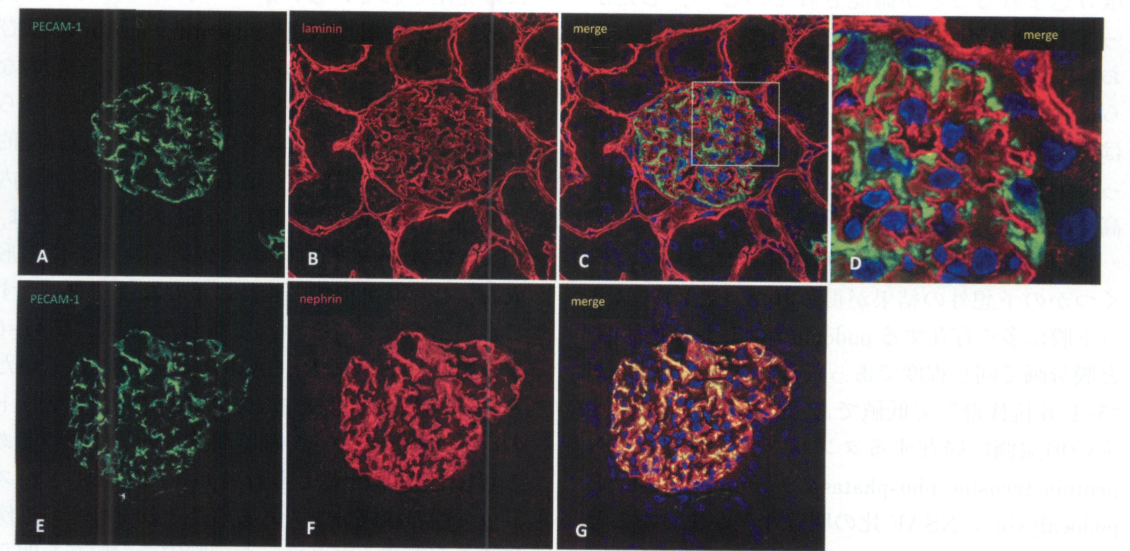


図 6 ラット糸球体の免疫蛍光染色

抗 PECAM-1 抗体 (緑色; A, C, D, E, G) と抗 laminin 抗体 (赤色; B, C, D) または抗 nephrin 抗体 (赤; F, G) によるラットの凍結腎組織の蛍光二重免疫染色像。核は DAPI 染色により青く染色されている。D は C の白枠の領域を拡大して表示している。
Scale bar = 25µm.

考 察

本研究ではEMARSという方法に注目し、ポドサイトのスリット膜近傍の膜タンパク質を選択的に回収する方法の確立をめざした。その結果、ネガティブコントロールである“KLH 抗体群”との比較から、スリット膜関連タンパク質が“5-1-6 抗体群”により多く濃縮されたことが明らかとなった。さらに、nephrin, Kin of IRRE-like protein 1 および podocin は EMARS 反応産物として同定されているが、スリット膜の細胞内の構成分子として知られる ZO-1³⁶⁾ および CD2AP³⁷⁾ は同定されていなかった。これは、本研究の方法によって目的のタンパク質がより選択的に回収された結果と考えられる。また“KLH 抗体群”で見られた糸球体内の弱い有意な蛍光は非特異的な fluorescein 標識と考えられるが、そのメカニズムに関してはいくつかの可能性が考えられる。これまでの研究では、ペルオキシダーゼ活性は ER およびゴルジのような細胞内オルガネラにおいても維持されており¹⁸⁾, nephrin はラフトおよびクラスリンを介するエンドサイトーシスの両方によって細胞内に取り込まれることが確認されている³⁸⁾。したがって、HRP 標識 nephrin を含むエンドソームにおいて予期しない標識が生じた可能性がある。さらに、糸球体内での発現レベルの高いタンパク質は HRP に依存せず内因性ペルオキシダーゼによって非特異的に fluorescein 標識される可能性が高くなるということも考えられる。

“5-1-6 抗体群”と膜分画の比較によって、いくつかの予想外の結果が得られた(表2)。スリット膜に多く存在する podocin が“5-1-6 抗体群”と膜分画で同じ程度であったこと、Ephrin B1 が“5-1-6 抗体群”で低値であったこと、ポドサイトの頂端側に局在するタンパク質でありながら protein tyrosine phosphatase, receptor type O と podocalyxin で NSAF 比の明確な差が生じたことである。EMARS では、HRP と FT の反応によって発生するラジカル種はタンパク質のチロシン残基と反応して共有結合すると考えられている¹⁸⁾。podocin はヘアピンループ状の膜結合領域を持つ

膜タンパク質であるが、この領域にチロシン残基を含まない。podocalyxin はその細胞外領域に1つのチロシン残基しか含まない。このため、“5-1-6 抗体群”で回収される量が少なくなったと考えられる。Ephrin B1 はポドサイトだけでなく内皮細胞でも発現していることが知られており³⁹⁾, このため膜分画での濃度が比較的に高くなったことが考えられる。

もう一つの膜分画の比較によって得られた予想外の結果は、内皮細胞での発現が報告されている PECAM-1 が“5-1-6 抗体群”で高値を示したことである。ウェスタンブロット、免疫沈降、免疫染色の結果は、抗 PECAM-1 抗体の特異性とポドサイトにおける局在を示している。PECAM-1 は、細胞接着分子の Immunoglobulin (Ig) スーパーファミリーの I 型膜貫通糖タンパク質であり、その細胞外ドメインは6つの Ig ドメインを含む。この分子は、細胞接着、機械的ストレス感知、抗アポトーシス作用および血管新生など様々な機能に関与する⁴⁰⁾。一般的には血小板、顆粒球、単球、リンパ球、マクロファージ、内皮細胞、および種々の腫瘍細胞で発現しており生理的状態の上皮細胞には見出されていないが^{41) 42)}, ポドサイトは間葉系起源の細胞で⁴³⁾ vimentin, nestin および desmin を発現しているといったような一般的な上皮細胞とは異なる性質を持つ^{44) 45)} ことが知られており、今回の発見はそのような非上皮細胞的な性質を支持している。さらに、ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた最近の研究では、PECAM-1 がタイトジャンクション複合体の形成およびバリア機能の維持に重要な役割を果たすことが示されている⁴⁶⁾。こうした報告と“5-1-6 抗体群”において PECAM-1 が濃縮されていたという結果をふまえると、PECAM-1 がラットのポドサイトにおいて細胞間接着分子の一つである可能性は十分考えられるが、PECAM-1 がスリット膜の構成分子であるのかそれともその近傍にのみ存在するかといった細胞内での局在を明らかにするためには免疫電子顕微鏡による観察が必須であり、今後の課題と考えられる。

現時点では、PECAM-1 はマウスやヒトのポド

サイトにおいて生理的条件下では発現していないと考えているが、ポドサイトは病的状態や発達段階においては生理的状态とは異なる細胞間接着を呈していることが知られており（スリット膜は減少し、ネフローゼの状態ではタイトジャンクションまたはギャップジャンクションで置換される⁴⁷⁾）、これらの状態における発現に関してはさらなる研究が必要である。結果の項でも言及したように、いくつかの variant が存在する可能性についても検討するべきであろう。これらの種のポドサイトがいかなる状態でも PECAM-1 を発現していないのであれば、この代わりを果たしているタンパク質を明らかにすることはポドサイトの性質を理解するうえで有用かもしれない。

分布、機能が不明であるが、“5-1-6 抗体群”のみに同定された膜タンパク質、また“KLH 抗体群”にも同定されたが“5-1-6 抗体群”で SAF 高値の膜タンパク質が他に多く同定されている。現在のところ特異抗体が入手できないため、スリット膜関連タンパク質かどうか検証困難であるが、今後のポドサイト研究における重要なリソースになると期待される。

結 論

これまでのポドサイトに関連するプロテオーム解析と比較して我々の方法の優れた点としては、生体内のポドサイトのスリット膜を中心としてより選択的にタンパク質を抽出できたことである。しかし、方法論としての問題点や限界も見えてきたように思われる。最も重要なのは抽出できるタンパク質が極端に限られていることであり、Fat1⁴⁸⁾ や TRPC6⁴⁹⁾ などのよく知られたスリット膜関連分子が同定されていない。また、内因性ペルオキシダーゼによる非特異的標識の問題や細胞外領域のアミノ酸配列（チロシン残基の数）によって標識の効率が変わる可能性もあることにも注意を要する。今回得られたプロテオーム解析結果についてより詳細な検討を加えてこの方法の評価を行うことが今後の課題と考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、研究支援やご指導を賜りました腎研究センター・腎構造病理学分野の矢尾板永信准教授と吉田 豊講師（現・研究推進機構共用設備基盤センター・設備戦略企画室）に深甚なる謝意を表します。また 5-1-6 抗体を御提供頂きました河内 裕教授（腎研究センター・腎分子病態学分野）、fluorescein-conjugated tyramide (FT) をご提供いただきました埼玉医科大学の小谷典弘准教授に深く感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Fukusumi Y, Miyauchi N, Hashimoto T, Saito A and Kawachi H: Therapeutic target for nephrotic syndrome: Identification of novel slit diaphragm associated molecules. *World J Nephrol.* 3: 77-84 2014.
- 2) Orikasa M, Matsui K, Oite T and Shimizu F: Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 141: 807-814, 1988.
- 3) Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A and Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein — nephrin — is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell.* 1: 575-582, 1998.
- 4) Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, Holmberg C and Tryggvason K: Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7962-7967, 1999.
- 5) Topham PS, Kawachi H, Haydar SA, Chugh S, Addona TA, Charron KB, Holzman LB, Shia M, Shimizu F and Salant DJ: Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin. *J. Clin. Invest.* 104: 1559-1566, 1999.
- 6) Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC,

- Niaudet P and Antignac C: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* 24: 349-354, 2000.
- 7) Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T, Gubler MC and Antignac C: Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am. J. Pathol.* 160: 131-139, 2002.
 - 8) Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstädt H and Walz G: NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J.* 17: 115-117, 2003.
 - 9) Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS and Chugh SS: Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J. Clin. Invest.* 112: 209-221, 2003.
 - 10) Lennon R, Randles MJ and Humphries MJ: The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne).* 5: 160, 2014.
 - 11) Inoue K and Ishibe S: Podocyte endocytosis in the regulation of the glomerular filtration barrier. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 309: F398-405, 2015.
 - 12) Grahammer F, Schell C and Huber TB: The podocyte slit diaphragm — from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol.* 9: 587-598, 2013.
 - 13) Boerries M, Grahammer F, Eiselein S, Buck M, Meyer C, Goedel M, Bechtel W, Zschiedrich S, Pfeifer D, Laloë D, Arrondel C, Gonçalves S, Krüger M, Harvey SJ, Busch H, Dengjel J and Huber TB: Molecular fingerprinting of the podocyte reveals novel gene and protein regulatory networks. *Kidney Int.* 83: 1052-1064, 2013.
 - 14) Rinschen MM, Schroeter CB, Koehler S, Ising C, Schermer B, Kann M, Benzing T and Brinkkoetter PT: Quantitative deep mapping of the cultured podocyte proteome uncovers shifts in proteostatic mechanisms during differentiation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 311: C404-417, 2016.
 - 15) Cui Z, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Nameta M, Magdeldin S, Makiguchi T, Ikoma T, Fujinaka H, Yaoita E and Yamamoto T: Profiling and annotation of human kidney glomerulus proteome. *Proteome Sci.* 11: 13-19, 2013.
 - 16) Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, Nagasaka Y, Tasaki M, Zhang Y, Xu B, Nameta M, Sezaki H, Cuellar LM, Osawa T, Morishita H, Sekiyama S, Yaoita E, Kimura K and Yamamoto T: In-depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two-dimensional protein prefractionation in combination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 6: 3680-3690, 2007.
 - 17) Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N and Honke K: Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105: 7405-7409, 2008.
 - 18) Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N and Honke K: Each GPI-anchored protein species forms a specific lipid raft depending on its GPI attachment signal. *Glycoconj. J.* 32: 531-540, 2015.
 - 19) Katsuya K, Yaoita E, Yoshida Y, Yamamoto Y and Yamamoto T: An improved method for primary culture of rat podocytes. *Kidney Int.* 69: 2101-2106, 2006.
 - 20) Nørgaard JO: Rat glomerular epithelial cells in culture. Parietal or visceral epithelial origin? *Lab Invest.* 57: 277-290, 1987.
 - 21) Peterson GL: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356, 1977.
 - 22) Katayama H, Nagasu T and Oda Y: Improvement of in-gel digestion protocol for peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15: 1416-1421, 2001.
 - 23) Paoletti AC, Parmely TJ, Tomomori-Sato C, Sato S, Zhu D, Conaway RC, Conaway JW, Florens L and Washburn MP: Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian mediator complexes using normalized spectral abun-

- dance factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 18928-18933, 2006.
- 24) Fujigaki Y, Morioka T, Matsui K, Kawachi H, Orikasa M, Oite T, Shimizu F, Batsford SR and Vogt A: Structural continuity of filtration slit (slit diaphragm) to plasma membrane of podocyte. *Kidney Int.* 50: 54-62, 1996.
- 25) Reiser J, Kriz W, Kretzler M and Mundel P: The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 1-8, 2000.
- 26) Nagai M, Yaoita E, Yoshida Y, Kuwano R, Nameta M, Ohshiro K, Isome M, Fujinaka H, Suzuki S, Suzuki J, Suzuki H and Yamamoto T: Coxsackievirus and adenovirus receptor, a tight junction membrane protein, is expressed in glomerular podocytes in the kidney. *Lab. Invest.* 83: 901-911, 2003.
- 27) Hashimoto T, Karasawa T, Saito A, Miyauchi N, Han GD, Hayasaka K, Shimizu F and Kawachi H: Ephrin-B1 localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocyte. *Kidney Int.* 72: 954-964, 2007.
- 28) Kerjaschki D, Sharkey DJ and Farquhar MG: Identification and characterization of podocalyxin—the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol.* 98: 1591-1596, 1984.
- 29) Patrakka J and Tryggvason K: Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396: 164-169, 2010.
- 30) Ebarasi L, Ashraf S, Bierzynska A, Gee HY, McCarthy HJ, Lovric S, Sadowski CE, Pabst W, Vega-Warner V, Fang H, Koziell A, Simpson MA, Dursun I, Serdaroglu E, Levy S, Saleem MA, Hildebrandt F and Majumdar A: Defects of CRB2 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 96: 153-161, 2015.
- 31) Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Holzman LB and Wiggins RC: GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *J. Biol. Chem.* 269: 19953-19962, 1994.
- 32) Tomas NM, Beck LH, Jr, Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G, Dolla G, Hoxha E, Helmchen U, Dabert-Gay AS, Debayle D, Merchant M, Klein J, Salant DJ, Stahl RA and Lambeau G: Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 371: 2277-2287, 2014.
- 33) Gödel M, Grahammer F and Huber TB: Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 372: 1073-1075, 2015.
- 34) Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC 2nd, Lyman S, Paddock C and Muller WA: PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247: 1219-1222, 1990.
- 35) Leucker TM, Bienengraeber M, Muravyeva M, Baotic I, Weihrach D, Brzezinska AK, Warltier DC, Kersten JR and Pratt PF Jr: Endothelial-cardiomyocyte crosstalk enhances pharmacological cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 51: 803-811, 2011.
- 36) Schnabel E, Anderson JM and Farquhar MG: The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol.* 111: 1255-1263, 1990.
- 37) Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH and Shaw AS: CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am. J. Pathol.* 159: 2303-2308, 2001.
- 38) Qin XS, Tsukaguchi H, Shono A, Yamamoto A, Kurihara H and Doi T: Phosphorylation of nephrin triggers its internalization by raft-mediated endocytosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 2534-2545, 2009.
- 39) Daniel TO, Stein E, Cerretti DP, St John PL, Robert B and Abrahamson DR: ELK and LERK-2 in developing kidney and microvascular endothelial assembly. *Kidney Int Suppl.* 57: S73-81, 1996.

- 40) Kitazume S, Imamaki R, Ogawa K and Taniguchi N: Sweet role of platelet endothelial cell adhesion molecule in understanding angiogenesis. *Glycobiology* 24: 1260-1264, 2014.
- 41) Tang DG, Chen YQ, Newman PJ, Shi L, Gao X, Diglio CA and Honn KV: Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J. Biol. Chem.* 268: 22883-22894, 1993.
- 42) Schramm HM: Should EMT of Cancer Cells Be Understood as Epithelial-Myeloid Transition? *J Cancer*. 5: 125-132, 2014.
- 43) Stamenkovic I, Skalli O and Gabbiani G: Distribution of intermediate filament proteins in normal and diseased human glomeruli. *Am. J. Pathol.* 125: 465-475, 1986.
- 44) Zou J, Yaoita E, Watanabe Y, Yoshida Y, Nameta M, Li H, Qu Z and Yamamoto T: Upregulation of nestin, vimentin, and desmin in rat podocytes in response to injury. *Virchows Arch* 448: 485-492, 2006.
- 45) Usui J, Kurihara H, Shu Y, Tomari S, Kanemoto K, Koyama A, Sakai T, Takahashi T and Nagata M: Localization of intercellular adherens junction protein p120 catenin during podocyte differentiation. *Anat Embryol (Berl)* 206: 175-184, 2003.
- 46) Ren Q, Ren L, Ren C, Liu X, Dong C and Zhang X: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) plays a critical role in the maintenance of human vascular endothelial barrier function. *Cell. Biochem. Funct.* 33: 560-565, 2015.
- 47) Caulfield JP, Reid JJ and Farquhar MG: Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. *Lab. Invest.* 34: 43-59, 1976.
- 48) Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T, Ohshiro K, Kawachi H, Okada H, Suzuki H, Kihara I and Yamamoto T: FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int.* 59: 1003-1012, 2001.
- 49) Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE and Pollak MR: TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat. Genet.* 37: 739-744, 2005.

(平成29年11月2日受付)