

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16278

研究課題名(和文)多発性嚢胞腎の病態におけるGタンパク受容体非依存性シグナルの役割の解明

研究課題名(英文)The role of non-G protein coupled receptor related signal transduction in the pathology of polycystic kidney disease

研究代表者

浜 武継 (Hama, Taketsugu)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00508020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：GタンパクはG_sとG_iに分かれ、それぞれシグナル伝達に関わっている。多発性嚢胞腎(PKD)の病態には、G_sによるGタンパク受容体(GPCR)刺激が関与している、との報告は多い。一方、G_iによるGPCR非依存性シグナルについての報告は少ない。TRIP13はG_iに結合するタンパクとして注目されており、PKDモデルマウスの腎臓では、TRIP13とG_iの結合が正常より減弱していた。GPCR非依存性の経路が、病態に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性嚢胞腎(PKD)は、常染色体優性遺伝型(ADPKD)と常染色体劣性遺伝型(ARPKD)とがある。ともに腎不全や高血圧、多くの合併症があり、その早期診断や治療の重要性が認識されている。PKDの研究には、G_sおよびGタンパク受容体(GPCR)に注目したものが多く、トルバプタンなどGPCR受容体阻害薬がPKDの治療として開発されてきた。しかし、GタンパクはG_sとG_iに分かれ、G_iもシグナル伝達に関与することが分かっている。これまでのGPCRに依存しないG_iとGPCR非依存性のシグナル伝達の役割が判明すれば、PKDの新たな治療を開く可能性がある。

研究成果の概要(英文)：G_s and G_i are dissociated from G protein. These two molecules are involved in signal transduction. In polycystic kidney disease (PKD), there are many reports that G_s and G protein coupled receptor (GPCR) are involved in the pathophysiology, whereas, there are few about G_i through non-GPCR. TRIP13, binding protein with G_i, is recently focused. In this study, we detected that TRIP13 bound with G_i were less in the kidney of PKD than in normal. Non-GPCR signal transduction may also be involved in the pathophysiology of PKD.

研究分野：腎臓病

キーワード：TRIP13 AGS7 アクセサリータンパク 多発性嚢胞腎 GPCR G

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease: PKD) は、腎臓の嚢胞形成などを特徴とする遺伝子疾患群である。常染色体優性遺伝型 (autosomal dominant PKD: ADPKD) と常染色体劣性遺伝型 (autosomal recessive PKD: ARPKD) とがある。ともに腎不全や高血圧、多くの合併症があり、その早期診断や治療の重要性が認識されている。

G タンパクは、 $\beta\gamma$ の 3 つの異なる subunit から構成される。細胞膜の G タンパク受容体 (G protein coupled receptor: GPCR) に ligand が結合すると $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ に分離し、それぞれシグナルを細胞内に伝達する。主に $G\alpha$ 由来のシグナルが注目され、現在流通している薬剤の大半は、この GPCR を介するシグナル伝達を修飾することで効果を発揮するものである。

PKD では GPCR に注目した研究が多い。PKD 治療薬の 1 つであるトルバブタンは、GPCR の一種バゾプレシン受容体の阻害薬である。PKD の原因遺伝子の 1 つである PKD1 の産物 PC-1 も、GPCR である。このように、PKD と GPCR には深い関連があるが、 $G\alpha$ 由来のシグナルのみが注目され、 $G\beta\gamma$ 関連のシグナルについての報告はほとんどない。

GPCR に依存せず G タンパクを $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ に分離させる「アクセサリータンパク」の存在が近年明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、PKD の病態における「GPCR 非依存性のシグナル伝達の役割」の解明を目的とした。具体的には、アクセサリータンパクの一種である、Activators of G protein signaling (AGS) のうち、AGS7 (TRIP13) に注目し、 $G\beta\gamma$ との関わりについて調べることにした。

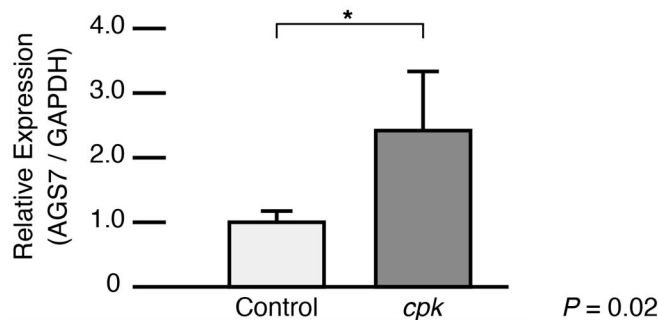
3. 研究の方法

生後 21 日の PKD モデルマウス (*cpk* マウス) と、同齢対照マウスを用いた。それぞれの腎臓を摘出し、染色用にパラフィン包埋した。また、RNA とタンパクを抽出した。タンパクは、総タンパクだけでなく、細胞質成分と核成分にも分けて抽出した。TRIP13 の RNA 発現を Real Time PCR で評価し、種々のタンパク発現を Western Blotting で評価した。タンパクの結合は co-immunoprecipitation を用いて評価した。

4. 研究成果

TRIP13 の RNA 発現は、*cpk* マウスで増加していた。(Figure 1)

Figure 1. Real Time PCR



AGS7 の RNA は、*cpk* で有意に発現していた

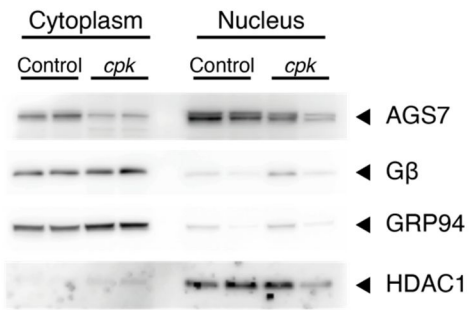
腎組織の染色の結果、TRIP13 は、PKD モデルマウスの核に強く発現していたが、対照マウスでは細胞全体に発現していた。

TRIP13 のタンパクは *cpk* マウスで減弱していた。

タンパクを細胞質と核に分画抽出すると、TRIP13 は細胞質と核で発現していたが、核により多い傾向が見られた。細胞質タンパクを用いた共免疫沈降の結果、*cpk* マウスでは TRIP13 と $G\beta$ の結合が低下していた。(Figure 2)

Figure 2. Western Blotting

Western Blotting (subcellular protein)



タンパクを
細胞質成分と核成分に分けた。
(GRP94: 細胞質タンパクマーカー)
(HDAC1: 核タンパクマーカー)

AGS7 は、Control、cpk ともに、
核で多かった。
Gβ は、cpk に多かった。

これらのことから、TRIP13 が Gβγ に直接結合することでシグナルを伝達する GPCR 非依存性経路が正常より PKD モデルマウスで減弱していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hama Taketsugu, Nakanishi Koichi, Sato Masashi, Mukaiyama Hironobu, Togawa Hiroko, Shima Yuko, Miyajima Masayasu, Nozu Kandai, Nagao Shizuko, Takahashi Hisahide, Sako Mayumi, Iijima Kazumoto, Yoshikawa Norishige, Suzuki Hiroyuki	4. 巻 313
2. 論文標題 Aberrant Smad3 phosphoisoforms in cyst-lining epithelial cells in the cpk mouse, a model of autosomal recessive polycystic kidney disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F1223 ~ F1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00697.2016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pressly Jeffrey D., Hama Taketsugu, Brien Shannon O', Regner Kevin R., Park Frank	4. 巻 7
2. 論文標題 TRIP13-deficient tubular epithelial cells are susceptible to apoptosis following acute kidney injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 43196 ~ 43196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep43196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taketsugu Hama, Yu Tanaka, Masashi Sato, Hironobu Mukaiyama, Hiroko Togawa, Yuko Shima, Koichi Nakanishi, Norishige Yoshikawa, Hiroyuki Suzuki.
2. 発表標題 Urine biomarkers efficacy as a disease-activity parameter for children with IgA nephropathy
3. 学会等名 Kidney Week 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浜 武継、島 友子
2. 発表標題 多発性嚢胞腎におけるActivators of G protein 7の関与
3. 学会等名 第62回 日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----