

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09242

研究課題名(和文) 非受容体型チロシンキナーゼFynは糖尿病性腎症でのオートファジー機構に関与するか

研究課題名(英文) Does nonreceptor type tyrosine kinase Fyn participate in autophagy mechanism in diabetic nephropathy ?

研究代表者

山田 英二郎 (Yamada, Eijiro)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60645563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroの系でFynはTgm2を直接リン酸化しうることが判明した。HK-2細胞に野生型Tgm2とリン酸化部位変異Tgm2を発現させBeclin1の架橋を確認したところ、変化はないことが判明した。HK2細胞でオートファジーfluxの検討を行ったところ、Tgm2を過剰発現した細胞でオートファジー活性の低下を認めた。この結果は糖尿病性腎症のメカニズムの解明に寄与する可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It was found that Fyn can directly phosphorylate Tgm2 in vitro. Wild type Tgm2 and phosphorylation site mutation Tgm2 were expressed in HK-2 cells, and the crosslinking of Beclin 1 was examined. It turned out that there was no change. When autophagy flux was examined in HK2 cells, autophagic activity was decreased in cells overexpressing Tgm2. This result seems to contribute to the elucidation of the mechanism of diabetic nephropathy.

研究分野：糖尿病性腎症

キーワード：Fyn Tgm2 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

糖尿病とそれに伴う合併症は世界で急激に増加傾向であり、日本でも糖尿病性腎症は末期腎不全の第1位の原因疾患となっている。その成因の第一は慢性の高血糖であるが、近年オートファジー機構が注目されつつある。

我々は骨格筋において、非受容体型チロシンキナーゼの一つである Fyn がオートファゴソームの誘導に重要であるとされている VPS34-Atg14-Beclin1 complex を介してオートファジー機構を調節し、その損耗に関与する事を近年報告した(Yamada E et al. Cell Rep. 2012)。

しかし Fyn がこの complex をどのように調節しているかは明らかではなく、さらに筋肉以外の組織でも同様のオートファジー機構が存在し、各種病態に関与している可能性は否定できない。

実際に我々は Fyn のノックアウトマウスや Fyn の阻害薬を用いた解析で Fyn が糖尿病状態やメタボリック症候群の病態に関する事を報告してきた(Yamada E et al. Cell Metab. 2010、Bastie CC et al. Cell Metab. 2007)。しかし、腎臓における Fyn の役割は未だ不明である。

2. 研究の目的

前記の背景をもとに申請者は糖尿病性腎症の病態に関与し、その治療の標的となり得る Fyn-Tgm2-Beclin1 を介したオートファジー調節機構に関する研究を行う。

Fyn による Tgm2 のチロシンリン酸化が、直接行われ、このリン酸化が Tgm2 の活性ならびに beclin1 の架橋反応を調節していることを確認する。

腎臓において、その活性調節によるオートファジーが糖尿病性腎症の発症メカニズムとなっていることを *in vitro* ならびに *in vivo* で確認する。

Fyn は VPS34-Atg14-Beclin1 complex 状態を変化させることでその活性を調節し、その結果オートファジー活性を調節する。

今回、腎臓においてメタボリックシグナルは Fyn を活性化するのか、Fyn による Tgm2 のチロシンのリン酸化によってその活性が調節されるか、この一連のシグナルが糖尿病性腎症の発症に関与するかを検討する。

3. 研究の方法

Fyn が Tgm2 のリン酸化することが、Beclin1 の架橋反応、オートファジー調節にどのように影響するかを確認する。

これまでの予備実験から、「Beclin1 の架橋反応を介してオートファジーを調節している

Tgm2 が Fyn によってリン酸化されていること」「Fyn, Tgm2 が尿細管細胞株においてもオートファジーを調節していること」、さらに「メタボリック症候群状態において Fyn の発現が上昇すること」が判明している。

本年度は Tgm2 は Fyn によって直接リン酸化されるかどうか、尿細管細胞株である HK2 細胞や E11 podocyte 細胞においてリン酸化された Tgm2 が Beclin1 をどのように修飾するか、さらに実際にオートファジーをどのように調節するのか、それが糖尿病性腎症に関与するとされている炎症惹起物質である TNF α や小胞体ストレス刺激物質タプシガルギンによってどのように調節されるか検討を行う。

大腸菌内に発現、単離精製した GST-Tgm2 と活性型 His-Fyn(購入可)を ATP/Mg を含んだバッファー内で *in vitro* の系にてリン酸化反応を行ったのち、SDS-PAGE に流し、リン酸化チロシン残基を特異的に認識する抗体にてウェスタンブロット法にて確認することで、実際に Tgm2 のチロシン残基が Fyn によって直接リン酸化されるかどうかを確認する。また Fyn によってリン酸化される 369 と 617 番目のリン酸化部位をフェニルアラニンに変異させた GST-Tgm2-Y369/617F を単離精製し、同様の実験を行い、この部位以外にリン酸化部位が存在するかの検討も行う。

Flag-Tgm2-WT とリン酸化部位に変異を導入した Flag-Tgm2-Y369/617F のベクターを用い Beclin1 の架橋反応を確認する。具体的にはこれらを HK2 細胞に発現し、抗 Beclin1 抗体を用いて Beclin1 を免疫沈降法によって得た後、架橋部位に挿入される N⁻-(γ -L-glutamyl)-L-lysine isopeptide を特異的に認識する抗体によりウェスタンブロット法で解析する。

HK2 細胞、もしくは E11 podocyte 細胞にて Flag-Tgm2-WT と Flag-Tgm2-Y369/617F を過剰発現し、オートファジーマーカーである LC3⁻、LC3⁻ / 比、p62 をウェスタンブロット法で解析する。さらにオートファジー阻害薬である塩化アンモニウムとロイペプチンを加えた系で、オートファジー flux も確認する。

HK2 細胞、もしくは E11 podocyte 細胞にて Tgm2 をノックダウンし、オートファジーの活性を上記と同様の系で確認する。さらにこの細胞において Fyn を過剰発現し、その変化を検討する。

HK2 細胞、もしくは E11 podocyte 細胞にて様々な濃度、時間で TNF α 、タプシガルギン刺激を行い、オートファジーの活性を確認する。

HK2 細胞、もしくは E11 podocyte 細胞

にてTgm2をノックダウンし、上記条件下にてTNFaもしくはタプシガルギン刺激を行い、Fynの活性、Tgm2のリン酸化、Beclin1の架橋反応、オートファジー活性を確認する。

db/dbマウス、高脂肪食摂取マウス、また糖尿病腎症の組織を用いて、マウスの腎臓におけるFyn、Tgm2、Beclin1の発現を確認する。各種ネフロンマーカーを用いた免疫染色法を用いて、これら蛋白の局在を確認する。

上記マウスの腎臓にてTgm2のリン酸化、Beclin1の架橋反応を確認する。9上記マウスの腎臓において、各種ネフロンマーカーとオートファジーマーカーであるLC3-II、LC3-I/II比、p62の共染色を行い、腎組織内でのオートファゴソームの形成、p62の蓄積状況を確認する。

Fynのノックアウトマウスの腎臓にてTgm2のリン酸化、Beclin1の架橋反応を確認する。

上記マウスに高脂肪食負荷を行い、腎症の発症の有無を確認する。具体的には、腎機能(血清クレアチニン、血中尿素窒素)、尿中アルブミン/クレアチニン、糸球体病変(結節性病変、メサングウム基質の増生など)、コラーゲン染色による線維化の有無を検証する。

上記マウスの腎臓にて、Tgm2のリン酸化、Beclin1の架橋反応を確認する。さらに各種ネフロンマーカーとオートファジーマーカーであるLC3-II、LC3-I/II比、p62の共染色を行い、腎組織内でのオートファゴソームの形成、p62の蓄積状況を確認する。さらにオートファジー阻害薬である塩化アンモニウムとロイペプチンを加えた系で、オートファジーfluxをin vivoで確認する。

4 研究成果

in vitroの系にて活性型His-FynとGST-Tgm2をバッファー中で反応させ、リン酸化されたタンパクを特異的に認識する抗体でウェスタンブロッティング法で解析を行なったところFynはTgm2を直接リン酸化することが可能であることが判明した。

HEK293T細胞、尿細管細胞株HK-2において、Flag-Tgm2-WTとリン酸化部位に変異を導入したFlag-Tgm2-Y369/617Fのベクターを過剰発現させて、抗Beclin1抗体を用いてBeclin1を免疫沈降法によって得た後、架橋部位に挿入されるN-(γ-L-glutamyl)-L-lysine isopeptideを特異的に認識する抗体によりウェスタンブロット法で解析するとBeclin1の架橋反応に変化はないことが判明した。

活性型Fynを過剰発現し、オートファジーマーカーであるLC3-II、LC3-I/II比、p62をウェスタンブロット法で解析したところオートファジーの阻害を認め、逆にFynをノックダウンしたところ、オートファジーの活性化を認めた。

HK-2細胞にTgm2を過剰発現し、オートファジーの阻害薬であるアンモニウムクロライドとロイペプチンを使用し、オートファジーfluxの検討を行ったところ、Tgm2を過剰発現した細胞でオートファジー活性の低下を認めた。

db/dbマウスにおいてFynの発現は変化を認めなかったがp62の発現には違いがあり、オートファジー状態の変化があることが示唆された。

これらの成果は糖尿病性腎症の新たなメカニズムの解明に寄与する可能性があると考えられその治療法に大きく貢献することができると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

第32回日本糖尿病合併症学会(2017年)
山田英二郎、澁澤良、笠井裕子、下田容子、大崎綾、斎藤従道、佐藤哲郎、岡田秀一、山田正信

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 英二郎 (YAMADA, EIJIRO)

群馬大学医学部附属病院・助教

研究者番号：60645563

(2) 研究分担者

前嶋 明人 (MAESHIMA, AKITO)

大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70431707

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()