

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06840

研究課題名(和文) 糖尿病合併症における核内糖修飾アクチンの役割の解明

研究課題名(英文) Study on the role of nuclear glycosylated actin in the diabetic complications

研究代表者

秋元 義弘 (Akimoto, Yoshihiro)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60184115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖修飾(O-GlcNAc化)アクチン抗体を作製し、免疫染色により正常のWistarラットと糖尿病モデルGKラットならびに健常人と糖尿病患者の組織における発現を比較検討した結果、特に糖尿病の腎臓において糖修飾アクチンが核と細胞質でいずれも増加していることが明らかになった。  
さらに、糖修飾アクチンと相互作用する核内タンパク質を調べるため、正常と糖尿病ラット腎臓の核画分タンパク質を、免疫沈降ならびにマスマスペクトロメトリーを行い、糖尿病で特に増加するタンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖修飾アクチンが核内でどのような役割を担っているかについての研究は、国内外を通じていまだ行われていない。本研究は、従来、糖尿病性合併症を起こすとして考えられていた病因に加えて、さらに核内アクチンの糖修飾(O-GlcNAc化)という観点から検討するところが独創的な点である。新たな病因の分子機序の解明に寄与すると考えられる。また、核内アクチンのO-GlcNAc化の程度を測定し、その亢進を抑制することができれば糖尿病合併症の診断、予防や治療に向けた基礎的知見として役立つことが期待される。本研究の進展により、将来的には糖尿病合併症の新しい治療法開発へと応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Antibody against glycosylated (O-GlcNAc-modified) actin was prepared and immunostaining was performed to compare the localization in tissues of normal and diabetic rat and human. It was shown that the immunostaining intensity both in the nucleus and cytoplasm increased in the diabetic tissues.

Furthermore, in order to investigate the nuclear protein that interacts with glycosylated actin, immunoprecipitation and mass spectrometry were performed on the nuclear fraction proteins of normal and diabetic rat kidneys, and proteins that were particularly increased in diabetes were identified.

研究分野：組織解剖学

キーワード：糖尿病合併症 糖修飾アクチン O-GlcNAc リン酸化 腎臓 網膜 坐骨神経

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アクチンは細胞骨格成分としての機能がよく知られているのに加えて、近年、核内において転写などの調節に関与することが明らかになりつつある。

アクチンは、リン酸化、糖修飾 (O-GlcNAc 化)、ユビキチン化、SUMO 化、アセチル化など様々な翻訳後修飾を受ける。これらの修飾によるアクチンの機能調節、さらに、修飾異常と心疾患やがんなど種々の疾患との関係が明らかになってきている (Terman JR, Kashina A, Curr Opin Cell Biol. 2013)。質量分析により、アクチンの糖修飾 (O-GlcNAc 化) 部位は 6 ヶ所あり、そのうち 3 ヶ所はリン酸化部位と一致していることが明らかになっているが、これらの部位の糖修飾が、アクチンの機能の調節にどのように関与しているか、さらに糖尿病合併症との関係については不明である。

核および細胞質タンパク質の多くは、アミノ酸のセリン、スレオニン残基に 1 個だけ N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が O-グリコシド結合する糖修飾 (O-GlcNAc 化) を受けている。この糖修飾部位はリン酸化の部位と同一またはその近傍にあるため、この糖修飾 (O-GlcNAc 化) はリン酸化を制御することにより、細胞内の重要な機能を調節している。糖尿病では転写調節因子など核内タンパク質の糖修飾 (O-GlcNAc 化) が亢進する (Hart et al. Nature 2007)。研究代表者らは、これまで II 型糖尿病モデル GK ラットの腎臓を用いて糖尿病合併症における基底膜をはじめとする形態変化と糖修飾との関係を検討してきた。その結果、糖尿病の糸球体基底膜の肥厚、糸球体上皮細胞足突起の融合、尿管の形態変化に伴い O-GlcNAc 化レベルが上昇することを明らかにした (Akimoto et al. Acta Histochem Cytochem 2005; Akimoto et al. Med Mol Morphol 2005)。また、O-GlcNAc 化の顕著に変化するタンパク質の同定をグライコプロテオミクスにより試み、アクチン、アクチニン 4 などの細胞骨格タンパク質を同定した (Akimoto et al. Clin Proteom 2011)。

### 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病合併症における糖修飾アクチンの核内での役割を解明し、糖尿病合併症の病因の新たな分子機序を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### <糖尿病合併症に伴う腎臓、神経、網膜における糖修飾アクチン発現の変化>

糖尿病モデル動物において糖尿病合併症が起こる腎臓、神経、網膜における糖修飾アクチンの発現の変化を免疫組織化学的に調べた。アクチンのアミノ酸配列の中で糖修飾とリン酸化の修飾が同じセリン残基で起こる 3 ヶ所の配列に対してそれぞれ糖修飾・リン酸化・非修飾ペプチドを作製し、ウサギポリクローナル糖修飾アクチン抗体、リン酸化アクチン抗体、非修飾アクチン抗体を作製した。この抗体を用いて糖尿病モデル動物 (GK ラット、KK マウス) 腎臓、神経、網膜における糖修飾アクチンの局在と発現量を免疫組織化学的に調べ、リン酸化アクチン、非修飾アクチンと比較検討した。

#### <糖修飾アクチンの核と細胞質との間の移行>

アクチンへの糖修飾を増加する、あるいは阻害する条件下で腎系球体上皮細胞を培養し、糖修飾アクチンの核 細胞質間のシャトリングを検討した。腎系球体上皮細胞を高濃度のグルコースあるいは加水分解酵素 O-GlcNAcase の阻害剤 Thiamet G 存在下で 1~8 日間培養することによりアクチンへの糖修飾を増加させ、その際の細胞の形態変化並びに糖修飾アクチンの局在を光顕、電顕レベルで検討した。さらに F-アクチンの脱重合を阻害するジャスプラキノライド、G-アクチンの重合を阻害するラトルンキュリン、あるいは F-アクチンのプラス端の伸長を阻害するサイトカラシンによる糖修飾アクチンの局在の変化を解析した。

#### <糖修飾の有無によるアクチンの核内での機能>

糖修飾アクチン抗体あるいは非修飾アクチン抗体を培養細胞に導入して、糖修飾の有無によるアクチンフィラメント形成への関与を解析した。

#### <糖修飾アクチンと相互作用する核内タンパク質の同定>

核画分タンパク質を、O-GlcNAc 化アクチン抗体を用いて免疫沈降した後、一次元の電気泳動にてバンドを検出した。さらに糖尿病合併症に伴い発現量が変化するタンパク質を、電気泳動解析ソフトウェアを用いて調べた。このようにして O-GlcNAc 化アクチンと結合して複合体を形成するタンパク質を含むバンドあるいはスポットをゲルから切り出し、トリプシン処理してマスス

ペクトロメトリーによりアミノ酸配列を調べ、既知のデータベースにより同定を試みた。

#### 4. 研究成果

1) リン酸化部位と同一である3ヶ所のうちの1ヶ所のO-GlcNAc化ペプチドを抗原として特異的O-GlcNAc化199Serineアクチンペプチド抗体を作製し、免疫染色により正常のWistarラット腎臓と比較し、糖尿病モデルGKラットの腎臓において糖修飾アクチンの局在が核と細胞質で増加していることを明らかになった。さらに糖尿病合併症と糖修飾アクチンとの関係を解明することを目的に糖尿病モデルGKラットの坐骨神経と網膜における糖修飾アクチンの局在を検討したところ、変化は認められなかった。

2) 糖尿病性腎症のヒト腎臓における糖修飾アクチンの役割を解明することを目的に、O-GlcNAc化ペプチドを抗原として作製した特異的O-GlcNAc化199Serineアクチンペプチド抗体を用いて、糖修飾アクチンの発現の変化について免疫組織化学的に光顕並びに電顕レベルで解析した。その結果、ヒトでも糖修飾アクチンの局在が核と細胞質で増加していることを明らかになった。

3) 核と細胞質との間のシャトリングにおけるアクチンの糖修飾の役割を明らかにするため、腎系球体上皮細胞を高濃度のグルコースあるいは加水分解酵素O-GlcNAcaseの阻害剤PUGNAc並びにThiamet G存在下で1から8日間培養することによりアクチンへの糖修飾を増加させ、その際の細胞の形態変化並びに糖修飾アクチンの局在を光顕、電顕レベルで検討した。さらにこれとは逆に、O-GlcNAc転移酵素の阻害剤Ac4SGlcNAc存在下で培養し、アクチンへの糖修飾を抑制したときの形態変化並びに糖修飾アクチンの局在を光顕、電顕レベルで検討した。さらに、培養系球体上皮細胞を用いて、F-アクチンの脱重合を阻害するジャスプラキノライド、G-アクチンの重合を阻害するラトルンキュリン、あるいはF-アクチンのプラス端の伸長を阻害するサイトカラシンによる糖修飾アクチンの局在の変化を、ライブイメージング法にて解析した。

4) 糖修飾の有無によるアクチンの核内での機能をしらべるため、糖修飾アクチン抗体を培養細胞にタンパク導入試薬を用いて導入して、核の形態変化を解析した。その結果、糖修飾アクチン抗体を導入された細胞では、核内にアクチン線維が形成された。これかことから糖修飾アクチンは、核内でアクチンフィラメントの形成を抑制する働きがあることが推測された。

5) 糖修飾アクチンの核内における機能を解明するため、糖修飾アクチンと相互作用する核内タンパク質の同定を行った。正常と糖尿病ラット腎臓の核画分タンパク質を、O-GlcNAc化アクチン抗体を用いて免疫沈降した後、一次元の電気泳動にてバンドを検出した。O-GlcNAc化アクチンと結合して複合体を形成するタンパク質を含むバンドをゲルから切り出し、トリプシン処理してマスマスペクトロメトリーによりアミノ酸配列を調べ、既知のデータベースにより同定を試み、いくつかのタンパク質を検出できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akimoto Yoshihiro, Yan Kunimasa, Miura Yuri, Tsumoto Hiroki, Toda Tosifusa, Fukutomi Toshiyuki, Sugahara Daisuke, Kudo Akihiko, Arai Tomio, Chiba Yuko, Kaname Shinya, Hart Gerald W., Endo Tamao, Kawakami Hayato	4. 巻 317
2. 論文標題 O-GlcNAcylation and phosphorylation of $\alpha$ -actin Ser199 in diabetic nephropathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F1359 ~ F1374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00566.2018	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 該当する
1. 著者名 Miura Yuri, Hayakawa Atsuko, Kikuchi Shohei, Tsumoto Hiroki, Umezawa Keitaro, Chiba Yuko, Soejima Yurie, Sawabe Motoji, Fukui Koji, Akimoto Yoshihiro, Endo Tamao	4. 巻 678
2. 論文標題 Fumarate accumulation involved in renal diabetic fibrosis in Goto-Kakizaki rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108167 ~ 108167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2019.108167	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 Yamaguchi Takashi, Ikehara Sanae, Akimoto Yoshihiro, Nakanishi Hayao, Kume Masahiko, Yamamoto Kazuo, Ohara Osamu, Ikehara Yuzuru	4. 巻 9
2. 論文標題 TGF- $\beta$ signaling promotes tube-structure-forming growth in pancreatic duct adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47101-y	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 Sakamoto Kenichi, Furuichi Yasuro, Yamamoto Masashi, Takahashi Megumi, Akimoto Yoshihiro, Ishikawa Takahiro, Shimizu Takahiko, Fujimoto Masanori, Takada Watanabe Aki, Hayashi Aiko, Mita Yoshitaka, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L, Ishibashi Ryoichi, Maezawa Yoshiro, Betsholtz Christer, Yokote Koutaro, Takemoto Minoru	4. 巻 20
2. 論文標題 R3hdml regulates satellite cell proliferation and differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e47957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201947957	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 該当する

1. 著者名 Fujihira Haruhiko, Masahara-Negishi Yuki, Akimoto Yoshihiro, Hirayama Hiroto, Lee Hyeon-Cheol, Story Benjamin A., Mueller William F., Jakob Petra, Clauder-M?nster Sandra, Steinmetz Lars M., Radhakrishnan Senthil K., Kawakami Hayato, Kamada Yoshihiro, Miyoshi Eiji, Yokomizo Takehiko, Suzuki Tadashi	4. 巻 1866
2. 論文標題 Liver-specific deletion of Ngly1 causes abnormal nuclear morphology and lipid metabolism under food stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 165588 ~ 165588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2019.165588	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 該当する

1. 著者名 Keigo Takeda, Hiromasa Yamada, Kenji Ishikawa, Hajime Sakakita, Jaeho Kim, Masashi Ueda, Jun-ichiro Ikeda, Yoshihiro Akimoto, Yosky Kataoka, Naoaki Yokoyama, Yuzuru Ikehara, Masaru Hori	4. 巻 5 2
2. 論文標題 Systematic diagnostics of the electrical, optical, and physicochemical characteristics of low-temperature atmospheric-pressure helium plasma sources.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Phys D: Appl Phys	6. 最初と最後の頁 165202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ide S, Finer G, Maezawa Y, Onay T, Souma T, Scott R, Ide K, Akimoto Y, Li C, Ye M, Zhao X, Baba Y, Minamizuka T, Jin J, Takemoto M, Yokote K, Quaggin SE	4. 巻 29
2. 論文標題 Transcription factor 21 is required for branching morphogenesis and regulates the Gdnf-axis in kidney development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol	6. 最初と最後の頁 2795-2808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2017121278	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 Itoh K, Akimoto Y, Kondo S, Ichimiya T, Aoki K, Tiemeyer M, Nishihara S	4. 巻 436
2. 論文標題 Glucuronylated core 1 glycans are required for precise localization of neuromuscular junctions and normal formation of basement membranes on Drosophila muscles.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Develop Biol	6. 最初と最後の頁 108-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2018.02.017	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 Pecori Federico, Akimoto Yoshihiro, Hanamatsu Hisatoshi, Furukawa Jun-ichi, Shinohara Yasuro, Ikehara Yuzuru, Nishihara Shoko	4. 巻 133
2. 論文標題 Mucin-type O-glycosylation controls pluripotency in mouse embryonic stem cells via Wnt receptor endocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.245845	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 Ishikawa Takahiro, Takemoto Minoru, Akimoto Yoshihiro, Takada-Watanabe Aki, Yan Kunimasa, Sakamoto Kenichi, Maezawa Yoshiro, Suguro Miyuki, He Liqun, Tryggvason Karl, Betsholtz Christer, Yokote Koutaro	4. 巻 99
2. 論文標題 A novel podocyte protein, R3h domain containing-like, inhibits TGF- $\beta$ -induced p38 MAPK and regulates the structure of podocytes and glomerular basement membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 859 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00109-021-02050-w	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秋元義弘, 楊國昌, 三浦ゆり, 津元裕樹, 戸田年総, 福富俊之, 菅原大介, 宮東昭彦, 新井富生, 千葉優子, 要伸也, Hart GW, 遠藤玉夫, 川上速人
2. 発表標題 糖尿病性腎症における糖修飾アクチンの免疫組織化学的解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihiro Akimoto
2. 発表標題 Histochemical analysis of galactose-binding lectin galectin: galectin expression in healing wounded skin treated with low-temperature plasma.
3. 学会等名 China-Japan High-end Forum on Medical and Health Cooperation. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋元義弘, 楊 國昌, 三浦ゆり, 津元裕樹, 岩本真知子, 戸田年総, 福富俊之, 菅原大介, 宮東昭彦, Hart Gerald W, 川上速人
2. 発表標題 ラット腎臓におけるリン酸化アクチンと糖修飾アクチンの局在
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋元義弘
2. 発表標題 糖修飾 (O-GlcNAc化) と糖尿病性腎症
3. 学会等名 第47回 腎研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋元義弘, 三浦ゆり, 福富俊之, 菅原大介, 宮東昭彦, Gerald W Hart, 遠藤玉夫, 楊國昌, 川上速人
2. 発表標題 糖尿病モデルGKラットの坐骨神経、網膜における糖修飾アクチンの局在
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋元義弘, 宮東昭彦
2. 発表標題 免疫電子顕微鏡法の基礎と応用
3. 学会等名 第45回組織細胞化学講習会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋元義弘
2. 発表標題 電顕チュートリアル 様々な試料作製法「細胞の構造と機能」
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第44回関東支部実技講習会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋元義弘, 三浦ゆり, 宮東昭彦, Hart GW, 遠藤玉夫
2. 発表標題 糖修飾・リン酸化ペー タ アクチンの核内における役割
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 Ohtsubo K, Kizuka Y, Taniguchi N, Takahashi M, Yanagisawa K, Kitazume S, Furukawa K, Ohmi Y, Furukawa K, Akimoto Y	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 368
3. 書名 Glycoscience: Basic Science to Applications	

1. 著者名 秋元義弘	4. 発行年 2019年
2. 出版社 学際企画	5. 総ページ数 233
3. 書名 組織細胞化学2019	



1. 著者名 Akimoto Y, Ikehara S, Yamaguchi T, Kim J, Kawakami H, Shimizu N, Hori M, Sakakita H, Ikehara Y	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 458
3. 書名 Plasma Medical Science	

1. 著者名 秋元義弘、宮東昭彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 学際企画	5. 総ページ数 250
3. 書名 組織細胞化学 2020 分子、形態、機能を捉える組織細胞化学 - 生命科学研究法の基本と応用を学ぶ	

1. 著者名 Yoshihiro Akimoto, Yuri Miura, Tamao Endo, Gerald W Hart	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 3355
3. 書名 Comprehensive Glycoscience, 2nd Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

顕微解剖学教室ホームページ  
<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/anat2/>

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
研究分担者	宮東 昭彦  (Kudo Akihiko)  (80255398)	杏林大学・医学部・准教授    (32610)	

	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
研究協力者	三浦 ゆり  (Miura Yuri)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・老化ゲノム機能研究チーム・副部長   (82674)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Georgia		