

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05907

研究課題名（和文）DGキナーゼを介した食品成分による糖尿病性腎症改善機構の解明とその応用

研究課題名（英文）Mechanism of DG kinase-mediated improvement of diabetic nephropathy by food ingredients and its application

研究代表者

白井 康仁 (Yuhito, Shirai)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：60263399

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎症の増悪化の原因のひとつにPKCの異常な活性化が挙げられる。一方、ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）は、PKC活性を間接的に抑制する酵素である。従って、食品成分によりこのDGKを活性化することにより糖尿病性腎症を改善・予防することができると期待される。本研究では、ビタミンE類やカテキンの1種であるエピガロカテキンガレート（EGCg）が67kDaラミニン受容体（67LR）の異なるサイトに結合するものの、共に67LRのパルミトイル化を誘導することにより、DGK $\alpha$ を活性化することによって糖尿病性腎症を改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、本研究によりトコフェロールやトコトリエノール等のビタミンE類やエピガロカテキンガレートに加え、ナリンゲニンが67LRを介してDGK $\alpha$ を活性化することを見出した。このことは、これらが糖尿病性腎症を予防あるいは改善できる機能性食品成分になりえることを強く示唆していた。本研究ではヒトへの効果まで検証できなかったが、実際、EGCgはヒトの糖尿病性腎症に効果があるとの論文が発表されている。また、本研究ではビタミンEの受容体として67LRが機能している可能性を見出した。これらの発見は、ビタミンEの抗酸化能以外の機能解明に大きな一石を投じると確信している。

研究成果の概要（英文）：Abnormal activation of PKC is one of the causes of exacerbation of diabetic nephropathy. On the other hand, diacylglycerol kinase (DGK) is an enzyme that indirectly inhibits PKC activity. Therefore, it is expected that activation of DGK by food ingredients can improve and prevent diabetic nephropathy. In this study, we found that vitamin E and epigallocatechin gallate (EGCg), a type of catechin, bind to different sites of the 67kDa laminin receptor (67LR), but together induce palmitoylation of the 67LR, thereby improving diabetic nephropathy by activating DGK $\alpha$  by inducing the palmitoylation of 67LR.

研究分野：食品科学

キーワード：ビタミンE カテキン 糖尿病 腎症 プロテインキナーゼC ジアシルグリセロールキナーゼ パルミトイル化 ラフト

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症の増悪化には糖化など様々な原因が知られているが、プロテインキナーゼ (PKC) の異常な活性化も関与していることが知られている。一方、ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、PKC を活性化するジアシルグリセロール (DG) を代謝することにより間接的に PKC を抑制する酵素である。従って、食品成分によりこの DGK を活性化することができれば糖尿病性腎症を改善あるいは予防することができると期待された。申請者は研究開始までにビタミン E である  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -Toc) やカテキンの 1 種であるエピガロカテキンガレート (EGCg) の経口投与が 67KDa ラミニンレセプター(67LR)を介して DGK $\alpha$  を活性化することにより糖尿病性腎症を改善することをマウスを用いて明らかにしてきた。しかし、ヒトに対する効果や、その改善機構などは未だ不明であった。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では  $\alpha$ -Toc 及び EGCg による 67LR を介した DGK $\alpha$  の活性化機構の解明及び、ヒト糖尿病性腎症に対する  $\alpha$ -Toc 及び EGCg の効果並びにその作用機序を調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) EGCg や $\alpha$ -Toc による 67LR の結合サイトの同定

FLAG-67LR とその点変異体を作製し、GFP-DGK $\alpha$  と共に DDT-MF2 細胞に発現させ、EGCg や  $\alpha$ -Toc で細胞を刺激した際の GFP-DGK $\alpha$  のトランスロケーションを共焦点顕微鏡で観察することにより、67LR 内の EGCg や  $\alpha$ -Toc による結合サイトに重要なアミノ酸を同定した。また、精製した 67LR を用いて水素-重水素交換質量分析に供することにより  $\alpha$ -Toc の 67LR 結合サイトを推定した。最終的に、MD シミュレーションにより、EGCg や  $\alpha$ -Toc と 67LR の結合を確認した。

### 1-1) リポフェクション

ガラスボトムシャーレ (MATSUNAMI、直径 3.5 cm) に、 $0.5 \times 10^5$  個の DDT1-MF2 細胞を播き、24 時間培養した。ガラスボトムシャーレ 1 枚につき、OPTI-MEM 300  $\mu$ l と Fugene HD Transfection Reagent (Promega) 5  $\mu$ l をよく混合した。この溶液に発現させたいタンパク質の cDNA をコードするプラスミドを 2  $\mu$ g 加え、よく混合し、室温で 10 分静置した。前日に播いたガラスボトムシャーレの中央に、調製した遺伝子導入溶液の全量をゆっくりと加え、24 時間培養した。

### 1-2) 細胞の刺激と観察

リポフェクション法を行ってから 24 時間後に、メタノールに溶解した 100mM EGCg 及び  $\alpha$ -Toc をそれぞれ、終濃度 200  $\mu$ M になるようにリンゲル液で希釈して細胞刺激を行った。4% PFA 液 800  $\mu$ l で細胞を固定させた後、0.3% Triton X を含む PBS-T 800  $\mu$ l で 30 分間インキュベートした。その後 PBS-T で 3 回洗浄し、2% NGS を含む PBS-T 800  $\mu$ l を添加し室温で 1 時間インキュベートした。PBS-T で三回洗浄した後、一次抗体(anti-FLAG 1/1000)を 4°C で一晩反応させた。その後 3 回洗浄し、二次抗体 (Alexa594,mouse,1/1000)を室温で 30 分間インキュベートした。PBS-T で洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡(FV-500 IX81 OLYMPUS)にて観察した。DGK $\alpha$  のトランスロ

ケーション率=膜局在が確認された細胞/観察した全細胞 (%) とした。

### 1-3) 水素-重水素交換質量分析法とシミュレーション

共同研究者に依頼した。

## 2) EGCg や $\alpha$ -Toc による DGK $\alpha$ の活性化機構の解明

### 2-1) 関与する因子の同定

上述のように EGCg や $\alpha$ -Toc で細胞を刺激する前に、様々な阻害剤を処置し、GFP-DGK $\alpha$  のトランスロケーションを指標に関与する因子を同定した。

### 2-2) 関与する因子との相互作用の検出

GFP-DGK $\alpha$  と FLAG-67LR を DDT1-MF2 細胞に共発現させ、200  $\mu$ M EGCg もしくは等量の溶媒を加えたもので 15 分間、37°C で刺激した。その後細胞可溶化液を調整し、FLAG 抗体ビーズを用いた免疫沈降に供した。FLAG-67LR と共沈した GFP-DGK $\alpha$  をウェスタンブロッティングにより検出した。同様の方法により、GFP-DGK $\alpha$  と FLAG-c-Src、及び GFP-c-Src と FLAG-67LR の結合も検証した。

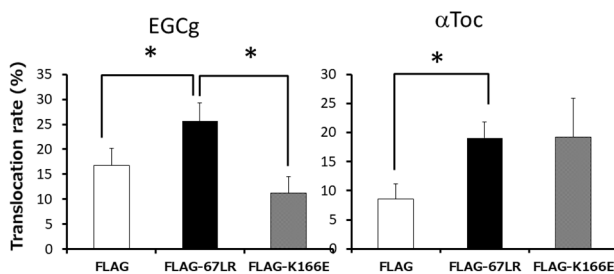
## 3) パルミトイル化の検出 (Acyl-rac 法)

遺伝子導入した DDT1-MF2 細胞を PBS で回収し、Blocking Buffer(100 mM HEPES pH7.4, 1 mM EDTA, 2.5% SDS, 0.1% MMTS)を用いて細胞を溶解させた。50°C で 10 分間インキュベートし、100%アセトンでタンパク質を沈殿させた。HES buffer [100 mM HEPES pH7.4), 1 mM EDTA, 1% SDS] を用いてタンパク質を溶解し、1M Hydroxylamine solution 及び Thiopropyl Sepharose と 2 時間反応させた。上清を捨て、HES Buffer で 5 回 wash し、5 $\times$ sample buffer で Sepharose に吸着していたタンパク質を溶出した。その後タンパク質を 5 $\times$ sample buffer で処理してから 10% separation gel の SDS-PAGE に供し、Western blotting によって評価した

## 4) その他 67LR を介して DGK $\alpha$ の活性化する食品成分の探索

EGCg や $\alpha$ -Toc 以外にも 67LR を介して同様に DGK $\alpha$  を活性化するか否かを上述のトランスロケーションを指標に調べた。

## 4. 研究成果



\*P<0.05

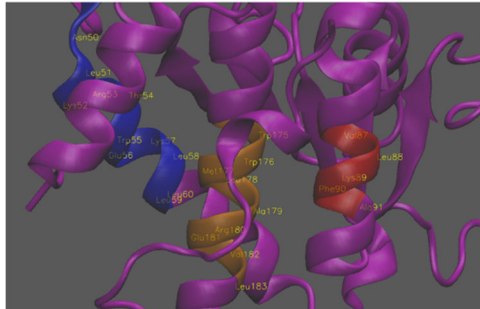
### 1) EGCg や $\alpha$ -Toc による 67LR の結合サイトの同定

まず、EGCg との結合に重要であると報告されていた 67LR の 166 番目の Lys に変異を導入した 67LR は予想通り EGCg による GFP-DGK $\alpha$  のトランスロケーションを誘導しなかったが、 $\alpha$ -Toc は

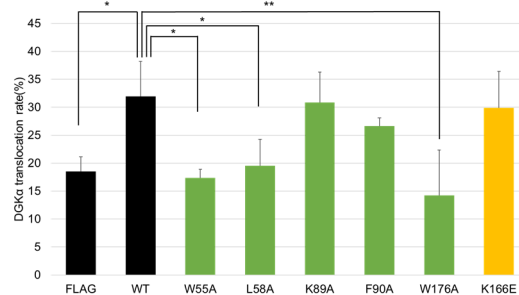
GFP-DGK $\alpha$  のトランスロケーションを誘導した (Fig.1)。

**Fig. 1 EGCg や $\alpha$ -Toc の異なる結合サイト**

このことは、EGCg 同様に、DGKalpha を活性化することによって糖尿病性腎症を改善する $\alpha$ -Toc は EGCg と異なるサイトで 67LR と相互作用し、GFP-DGKalpha を活性化していることを示唆していた。そこで、重水素置換質量分析法により $\alpha$ -Toc と 67LR の結合サイトを調べたところ、からなるポケットが明らかとなった (Fig. 2)。そこで、これらのアミノ酸に点変異を導入した 67LR を用いて、 $\alpha$ -Toc は GFP-DGKalpha のトランスロケーションを調べたところ、Trp55, Lui5, Trp176 の変異でトランスロケーションが消失した (Fig. 3)。このことは、これらのアミノ酸が EGCg ではなく、 $\alpha$ -Toc との結合に重要であることを示していた。最終的に、シミュレーションを用いて EGCg と $\alpha$ -Toc が 67LR の異なるサイトに結合することを明らかにした。尚、これらの成果を J.



Nutr Biochem に発表した。

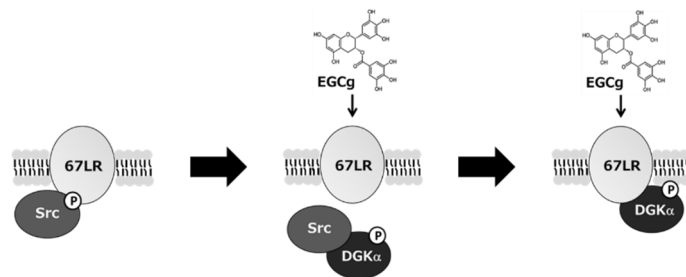


**Fig. 2 67LR 内の $\alpha$ -Toc 結合領域**

**Fig. 3  $\alpha$ -Toc 結合サイトの同定**

## 2) EGCg や $\alpha$ -Toc による DGKalpha の活性化機構の解明

EGCg が DGKalpha を活性化する機構を調べた結果、EGCg が 67kDa ラミニン受容体(67LR)の細胞外ドメインに直接結合すると、Src 系チロシンキナーゼ(c-Src)及び DGKalpha が膜直下で直接複合体を形成し、DGKalpha がリン酸化されることによって活性化されることを見出した成果について発表した。



**Fig. 4 EGCg による DGKalpha の活性化機構**

ついで、EGCg と $\alpha$ -Toc が異なるサイトに結合するにもかかわらず、なぜ同様に DGKalpha を活性化するのかを調べるために、67LR の局在に着目した。67LR はラフトに局在していると報告されていたため、ラフト局在が DGKalpha の活性化に重要であるか否かをラフトを破壊する M $\beta$ CD を用いて実験を行った。その結果、M $\beta$ CD で処理すると、 $\alpha$ -Toc 及び EGCg による DGKalpha のトランスロケーションは消失した (Fig. 5) ことから、 $\alpha$ -Toc 及び EGCg による DGKalpha の活性化には 67LR のラフト局在が重要であることが明らかになった。

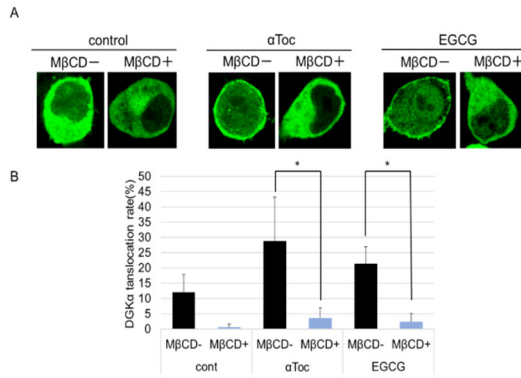


Fig. 5 ラフト破壊の影響

一方、ラフトに存在する多くのタンパク質はパルミトイル化を受けていることが知られているため、67LRのパルミトイル化を調べた。その結果、 $\alpha$ -Toc及びEGCGで細胞を刺激すると67LRのパルミトイル化が誘導されることが明らかとなった(Fig. 6)。

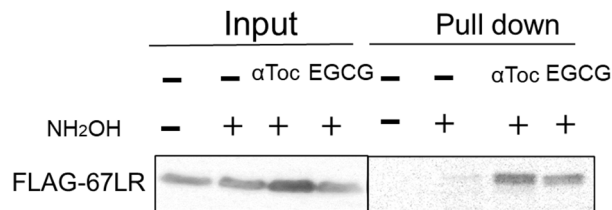


Fig. 6 EGCG及び $\alpha$ -Tocによる67LRのパルミトイル化

そこで、67LRのパルミトイル化部位の同定を行った。パルミトイル化はCysで起こるため、67LRの2つCysをAlaに置換した67LR変異体を用いて、 $\alpha$ -Toc及びEGCGによるDGK $\alpha$ のトランスロケーションを観察した。その結果、共に163番目のCysが重要であることが明らかになった。

### 3) その他67LRを介してDGK $\alpha$ の活性化する食品成分の探索

さらに、EGCGや $\alpha$ -Toc同様クロマン環構造をもつナリンゲニンが、67LRを介して、DGK $\alpha$ を活性化するか否か調べたところ、ナリンゲニンも67LRを介してDGK $\alpha$ を活性化することが明らかになった(Chinthammit et al., 2021)。しかし、このナリンゲニンは、67LRとビタミンE結合サイトを介して相互作用することが示唆されたが、ビタミンEによる67LRのパルミトイル化と、ナリンゲニンによるパルミトイル化には違いが見られた。そこで今後、両者のパルミトイル化の生理的意義と、ナリンゲニンが糖尿病性腎症を抑制するのか今後検討していく予定である。

一方、 $\alpha$ -Tocとよく似た構造を持つVitamin Eのひとつである $\alpha$ -Tocotrienol ( $\alpha$ - $\square$ )についても同様の実験を行ったところ、 $\alpha$ -T3は $\alpha$ -Tocと同様のサイトで67LRに結合し、同じく同様に163番目のCysのパルミトイル化を誘導することによりDGK $\alpha$ を活性化することを明らかにした。今後、DGK $\alpha$ を活性化における67LRのパルミトイル化の生理的意義を明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Boonyaporn Chinthammit, Seika Okamoto, Yasuhito Shirai	4. 巻 12
2. 論文標題 Almond Skin Polyphenol Extracts Stimulate the Activation of Diacylglycerol Kinase alpha via a 67 kDa Laminin Receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Functional Food in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 151-160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31989/ffhd.v12i4.894	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 -

1. 著者名 5)Daiki Hayashi D, Kinging Wang, Shuji Ueda S, Minoru Yamanoue M, Hitoshi Ashida, Yasuhito Shirai	4. 巻 10
2. 論文標題 The mechanisms of ameliorating effect of a green tea polyphenol on diabetic nephropathy based on diacylglycerol kinase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 11790-11802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68716-6	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 -

1. 著者名 Daiki Hayashi, Varnavas D. Mouchlis, Seika Okamoto, Tomoka Namba, Liuqing Wang, Sheng Li , Shuji Ueda , Minoru Yamanoue , Hirofumi Tachibana, Hiroyuki Arai, Hitoshi Ashida, Edward A. Dennis, Yasuhito Shirai	4. 巻 110
2. 論文標題 Vitamin E functions by association with a novel binding site on the 67 kDa laminin receptor activating diacylglycerol kinase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 109129-109131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2022.109129	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 該当する

1. 著者名 Daiki Hayashi & Yasuhito Shirai	4. 巻 27
2. 論文標題 The Role of Diacylglycerol Kinase in the Amelioration of Diabetic Nephropathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6784-6799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27206784.	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本聖香
2. 発表標題 Vitamin E induces palmitoylation of 67kDa laminin receptor by direct binding
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 岡本聖香
2. 発表標題 67kDaラミニンレセプターはビタミンEとの結合によりパルミトイル化修飾を受ける
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本聖香
2. 発表標題 Vitamin E induces palmitoylation of 67kDa laminin receptor by direct binding
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 難波明花
2. 発表標題 -トコトリエノールは67kDaラミニン受容体に結合し、DGK を活性化させる
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 難波朋花
2. 発表標題 トコトリエノールは 67LR を介して DGK を活性化する
3. 学会等名 第32回ビタミンE研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ジアシルグリセロールキナーゼ 活性化剤	発明者 白井康仁、ブンヤボン・チムタムニット、宅見央子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-95378	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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	UCSD		