

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590260

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症に伴う糸球体分子構築の変化の解析

研究課題名(英文) Analysis on changes in the molecular structure of glomerulus accompanying with diabetic nephropathy

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症では、糸球体基底膜、メサンギウム、糸球体上皮細胞、内皮細胞に形態変化が生ずることがよく知られているが、これらの形態変化に伴う分子構築の変化については不明な点が多い。本研究では、O-グリコシド結合N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)とよばれる糖のタンパク質への修飾を指標にして糖尿病性腎症に伴う糸球体の分子構築の変化を解明することを目的に、糸球体を単離し、プロテオミクス並びに免疫組織化学によりO-GlcNAc修飾タンパク質の解析を行った。その結果、糸球体上皮細胞に特異的に発現するシナプトポディンなどにO-GlcNAc修飾の変化が起こり、それに伴い局在が変化することが判明した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that the changes in morphology of the glomerular epithelium, endothelium, basement membrane and mesangium occur in the diabetic nephropathy. However, the change of these structures at the molecular level is not examined yet. In this study to elucidate the etiology of diabetic nephropathy the change of the molecular structure of glomerulus was examined by the proteomics of O-GlcNAc-modified proteins from isolated glomeruli and immunohistochemistry. It was revealed that in the diabetic glomerulus some proteins including synaptopodin which was expressed specifically in the glomerular epithelial cells increased in O-GlcNAc-modification, and the localization of the O-GlcNAc-modified proteins changed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 ヘキソサミン代謝 糸球体 O-GlcNAc 糖尿病性腎症 糖転移酵素 基底膜 グライコプロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症の病変 糖尿病性腎症では糸球体基底膜の肥厚とメサンギウム拡大が特徴的病変として知られているが、近年、さらに上皮細胞の変化が腎症の成因に関与するとして注目されている。糖尿病性腎症では上皮細胞のアポトーシスおよび糸球体基底膜からの剥離により、上皮細胞数の減少が起こり、その代償機構として足突起幅の増大が起こると考えられている (Wolf G, et al., *Diabetes* 54:1626-1634, 2005)。

糖尿病性腎症の病因 従来、非酵素的グリコシレーションの加速化、ジアシルグリセロールの増加とPKC活性の上昇、ポリオール代謝亢進、酸化ストレスの亢進が考えられている。これに加え、近年、第5の病因としてヘキサミン代謝亢進によるタンパク質へのO-グリコシド結合N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)とよばれる糖の修飾(O-GlcNAc化)亢進が提唱されている (Brownlee M, *Nature* 414: 813-820, 2001, Hart GW, et al., *Nature* 446:1017-1022, 2007)。

予備的データ これまで2型糖尿病モデルGKラットの腎臓、眼球、神経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O-GlcNAc化との関係を検討してきた。その結果、糖尿病の組織において基底膜および上皮細胞の形態変化(肥厚、上皮細胞からの剥離)に伴いO-GlcNAc化レベルが上昇することを明らかにした(Akimoto Y, et al., *Acta Histochem. Cytochem.* 36: 131-142, 2005; Akimoto Y et al., *Med. Mol. Morphol.* 38: 84-91, 2005)。さらに、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た。その結果、 α -アクチニン4をはじめとする細胞骨格系のタンパク質が同定され、その局在の変化が明らかになった(Akimoto Y, et al., *Clin. Proteom.* 8: 15, 2011)。以上のことから「糖尿病性腎症に伴う糸球体基底膜や上皮細胞の形態変化は、タンパク質のO-GlcNAc化の異常が一つの現因である」という作業仮説が見出された。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症では、糸球体基底膜、メサンギウム、上皮細胞、内皮細胞に形態変化が生ずることがよく知られているが、これらの形態変化に伴う分子構築の変化については不明な点が多い。研究代表者は、予備的な実験で、糖の修飾(O-GlcNAc化)の変化を指標にして、糖尿病の腎系球体における α -アクチニン4をはじめとする細胞骨格タンパク質の局在の変化を明らかにしてきた。さらに本研究では糖尿病性腎症に伴う糸球体の分子構築の変化をO-GlcNAc化を指標にしてプロテオミクス並びに免疫組織化学を用いて解明することを目指す。

3. 研究の方法

1) 糖尿病性腎症に伴いO-GlcNAc化が変化するタンパク質の同定:

糖尿病モデル動物(GKラット)腎臓を用いて、総タンパク質あるいは細胞質画分、核画分を分離し、タンパク質を2次元電気泳動した後、O-GlcNAcに対するモノクローナル抗体(RL2, CTD110.6)を用いてO-GlcNAcの修飾が変化するタンパク質を、二次元電気泳動解析ソフトウェア(PD Quest)を用いて調べる。このようにして単離されたO-GlcNAc化が顕著に変化するタンパク質をPVDF膜にプロット後、トリプシン処理して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タンパク質を同定する。

2) 上述の方法で同定されたタンパク質のO-GlcNAc化量の検討:

同定されたタンパク質のO-GlcNAc化の変動が、タンパク質自身の発現量の変化によるか、タンパク質の発現量は同じでO-GlcNAc化の変化によるものか、あるいは両者によるものかについて、抗体を用いた免疫沈降法とイムノプロット法により明らかにする。これにより明らかにO-GlcNAc化自身が有意に変化するタンパク質であるかどうかを検討する。

3) 糖尿病の腎系球体上皮細胞、内皮細胞、基底膜、メサンギウムにおける糸球体構成分子の局在の免疫組織化学による検討:

組織をアルデヒド前固定後、凍結切片を作製、同定された糸球体構成分子に対する市販の抗体と反応させ、蛍光法またはHRP法にて局在部位を光顕的に観察する。電顕観察には、包埋前染色法(HRP標識法)、包埋後染色法(LR White包埋等/コロイド金標識法)、凍結超薄切片法(コロイド金標識法)を用いる。一方、市販されている抗体がない場合には、上記各組織よりタンパク質を抽出し、精製、抗血清(家兎)やモノクローナル抗体を作製する。並行して各組織のlysateを作製、イムノプロット法により組織内に含まれるタンパク質量の増減や消長を確認する。

4) 基底膜やメサンギウム基質など細胞外マトリックスの構成タンパク分子がO-GlcNAc化されているかどうかについての検討:

下記の細胞外マトリックス構成タンパク質に対する抗体を用いて、これらを免疫沈降し、抗O-GlcNAc抗体を用いてイムノプロットすることにより、O-GlcNAc化されているか、さらに糖尿病でO-GlcNAc化が変化するかを検討する。

コラーゲン(Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ型),
ラミニン, フィブロネクチン,
ヘパラン硫酸プロテオグリカン, ガレクチン,
ニドゲン, ミクロフィブリル, フィブリリン,
エラスチン, テネイシン, etc.

5) O-GlcNAc 化された糸球体構成分子の局在の検討：

本研究者は既に *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA) 法により、腎糸球体における O-GlcNAc 化タンパク質の局在を検出できることを証明している(Akimoto Y, et al., *Clin. Proteom.* 8: 15, 2011)。この *in situ* PLA 法により、糸球体構成分子に対する抗体と抗 O-GlcNAc 抗体の二つの抗体を用いて、O-GlcNAc 化されたタンパク質分子の局在ならびに量を免疫組織化学的に調べ、O-GlcNAc 化されていない分子の局在ならびに量と比較検討する。

6) O-GlcNAc 化を促進あるいは抑制する薬剤による腎糸球体上皮細胞の形態変化の検討：腎糸球体上皮細胞を高濃度のグルコースあるいは O-GlcNAcase の阻害剤 PUGNAc (100 µg/ml) 存在下で 1～8 日間 *in vitro* で培養して O-GlcNAc 化を促進し、その形態変化を顕微鏡、電顕レベルで検討する。さらに、これとは反対に、O-GlcNAc 転移酵素の発現を RNAi 法で抑制して、O-GlcNAc 化を抑制したときの形態変化を検討し、O-GlcNAc 化の役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 糖尿病性腎症に伴う糸球体の分子構築の変化を O-GlcNAc 化タンパク質を指標にして解明するために、糖尿病性腎症に伴い O-GlcNAc 化が変化する糸球体タンパク質の同定と α -アクチニン 4、アクチンの 2 つのタンパク質における O-GlcNAc 化部位の同定を実施した。

糖尿病モデル動物 (GK ラット) と正常 Wistar ラット (雄、各 3 匹) の腎臓を用いて、腎臓から糸球体を単離し(Katsuya et al., *Kidney Int* 69: 2101, 2006 の方法) さらに抗 O-GlcNAc 抗体を結合させた磁気ビーズで、O-GlcNAc 化タンパク質を免疫沈降してから、糸球体構成タンパク質を LC MS/MS にて分離、O-GlcNAc 化タンパク質の量を比較し、糖尿病にて顕著に変化する O-GlcNAc 化タンパクの同定を行った。その結果、糖尿病で O-GlcNAc 化が有意に変化するいくつかのタンパク質が同定された。

これまでの研究により糖尿病に伴い α -アクチニン 4、チューブリン、アクチン、ミオシンなど糸球体の形態維持に重要な細胞骨格タンパク質が O-GlcNAc 化の増加が認められた(Akimoto Y, et al., *Clin. Proteom.* 8: 15, 2011)。このうち α -アクチニン 4 はアクチンフィラメントを互いに架橋し、足突起の構造の維持、形態変化に関与し、またスリット膜の構造を維持の役割を担っていることが知られている。このことから、さらに α -アクチニン 4 とアクチンに注目し、O-GlcNAc 化部位の同定を試みた。糖尿病 GK ラットの腎臓の総タンパク質を 2 次元電気泳動した後、 α -アクチニン 4、アクチンのスポットを切出し、

LC-MS/MS による O-GlcNAc 化部位の同定を行った。しかし、レーザーによるイオン化の過程で O-GlcNAc が消失してしまい、修飾部位の同定をすることが出来なかった。

(2) 細胞骨格への糖の修飾がどのような影響を及ぼすかを調べることを目的として、顕著に変化の認められた α -アクチニン 4 に注目し、糸球体における局在の変化を免疫組織化学的に解析した。その結果、 α -アクチニン 4 は糸球体上皮細胞に局在し、糖尿病では発現が増加し、かつ局在が乱れることが明らかになった。さらに *in situ* PLA 法にて検討したところ、糖尿病において O-GlcNAc 化 α -アクチニン 4 の増加が観察された。さらに、培養した糸球体上皮細胞を用いて、高グルコース存在下での α -アクチニン 4 の局在の変化および糖修飾阻害剤の影響を検討した。高グルコース存在下で 1 日から 3 日培養した糸球体上皮細胞では α -アクチニン 4 の局在の変化はほとんど観察されなかった。これに対し、O-GlcNAcase 阻害剤存在下で糸球体上皮細胞を培養し、O-GlcNAc 化を上昇させると、ストレスファイバー並びに細胞突起の形成が阻害され、 α -アクチニン 4 の局在が変化した。

(3) さらに糸球体構成タンパク質への O-GlcNAc 化の変化を調べるため、糸球体を単離し、プロテオミクスにより O-GlcNAc 化タンパク質の解析を行った。その結果、上記の細胞骨格やミトコンドリアタンパク質に加えて糸球体上皮細胞に特異的に発現するシナプトポディンに O-GlcNAc 化が起こることが明らかになった。さらにその O-GlcNAc 化ならびにその局在の変化について検討した。またこれまでの研究より、糖尿病において O-GlcNAc 化 α -アクチニン 4 と O-GlcNAc 化アクチンとの相互作用の増加が観察され、培養糸球体上皮細胞において、O-GlcNAc 化の増加は、ストレスファイバーならびに細胞突起の形成を阻害することが明らかになったことから、O-GlcNAc 化アクチンに対する抗体を作製した。今後、この抗体を用いて O-GlcNAc 化に伴うアクチンの局在の変化について検討する予定である。さらに、細胞外マトリックスの構成タンパクへの O-GlcNAc 化を検討したところ、ガレクチンが O-GlcNAc 化されていることが明らかになった。研究代表者らは、既にガレクチンが糸球体基底膜に局在し、病態に伴い変化することを免疫電顕で明らかにしている(Shimizu M, et al., *Lab. Invest.* 89:178-195, 2009)。これらのことから、ガレクチンの O-GlcNAc 化の変化と糖尿病性腎症における基底膜の形態変化との関係が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Tsumoto H, Ogasawara D, Hashii N, Suzuki T, Akimoto Y, Endo T, Miura Y: Enrichment of *O*-GlcNAc-modified peptides using novel thiol-alkyne and thiol-disulfide exchange. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有 pii: S0960-894X(15)00414-X. 2015. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.04.082.

Akimoto Y, Kawakami H: Histochemical staining using lectin probes. *Lectins Hirabayashi J. (Ed.) Methods Mol. Biol.* 査読有, 1200:153-163, 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-1292-6_14.

秋元義弘、三浦ゆり、戸田年総、Gerald W Hart、遠藤玉夫、川上速人: 糖鎖と疾患、蛋白質の *O*-GlcNAc 修飾と糖尿病 病理と臨床 査読無, 31 (8): 847-851, 2013.

http://www.bunkodo.co.jp/byori_35/magazine_detail_4.html

[学会発表](計 10 件)

秋元義弘: シンポジウム「糖鎖生物学と組織細胞化学の接点」タンパク質の *O*-GlcNAc 修飾と糖尿病. 第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 松本、平成 26 年 9 月 27-28 日

Akimoto Y, Miura Y, Toda T, 他 7 名: Molecular morphological changes in the glomerulus associated with the elevation of *O*-GlcNAcylation in diabetic nephropathy. The 18th International Microscopy Congress (IMC 2014), Prague, Czech Republic, Sept. 7-12, 2014

秋元義弘、三浦ゆり、戸田年総、他 5 名: 糖尿病性腎症に伴う糸球体における α -アクリニン 4 の局在の変化. 日本顕微鏡学会第 70 回学術講演会 千葉、平成 26 年 5 月 11 日-13 日

秋元義弘、三浦ゆり、戸田年総、福富俊之、菅原大介、Gerald W Hart、遠藤玉夫、川上速人: 糖尿病性腎症に伴う糸球体タンパク質の糖修飾異常の解析. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 下野、平成 26 年 3 月 27-29 日

Akimoto Y, Miura Y, Toda T, 他 8 名: Morphological changes in diabetic kidney are associated with increased *O*-GlcNAc modification of cytoskeletal proteins. World Diabetes Congress 2013, Melbourne, Australia, Dec 2-6, 2013

秋元義弘: *O*-GlcNAc 修飾と糖尿病. 第 11 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 仙台、平成 25 年 10 月 25-26 日

Akimoto Y, Miura Y, Toda T, 他 8 名: Changes of the *O*-GlcNAc modification of proteins accompanied with diabetic

nephropathy. 12th HUPO World Congress, Yokohama, Sept. 14-18, 2013
秋元義弘、三浦ゆり、戸田年総、他 4 名: 糖尿病性腎症に伴うタンパク質への糖修飾異常の解析. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 高松、平成 25 年 3 月 28-30 日.

Akimoto Y, Miura Y, Toda T, 他 6 名: *O*-GlcNAc modification of proteins and diabetes. International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences, Tokyo, Nov. 30-Dec. 1, 2012

Akimoto Y, Miura Y, Toda T, 他 6 名: Detection of *O*-GlcNAcylated proteins by glycoproteomics and *in situ* proximity ligation assay (PLA). ICHC2012: 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Kyoto, Aug. 26-29, 2012

[図書](計 1 件)

Akimoto Y, Miura Y, Endo T, Kawakami H, Hart GW: Diabetes and *O*-GlcNAcylation. In *Glycoscience: Biology and Medicine.* (Taniguchi N, Endo T, Hart GW, Seeberger PH, Wong C-H, Eds.) Springer, 10.1007/SpringerReference_395455:

1207-1212, 2015

ISBN 978-4-431-54840-9

6. 研究組織

(1)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