

論 文 内 容 要 旨

題目 Dynamics of D-amino acid oxidase in kidney epithelial cells under amino acid starvation

(アミノ酸飢餓下の腎臓上皮細胞における D-アミノ酸酸化酵素の動態)

著者 Hirofumi Sogabe, Yuji Shishido, Hayato Miyazaki, Soo Hyeon Kim, Wanitcha Rachadech, Kiyoshi Fukui
令和3年発行 The Journal of Biochemistry に掲載予定

内容要旨

D-アミノ酸酸化酵素(DAO)はフラビンアデニンジヌクレオチドを補酵素としてもつフラビン酵素である。この酵素は、哺乳動物の腎臓、肝臓、脳に存在し、中性・塩基性のD-アミノ酸を α -ケト酸、アンモニア及び過酸化水素に分解している。腎臓では近位尿細管上皮細胞に発現しており、原尿から再吸収されたD-アミノ酸を代謝していると考えられている。この酵素の発現機構については2種類のpaired box遺伝子(PAX2とPAX5)が異なる2つのプロモーターにより転写調節することが報告されている、一方、その代謝経路については未だに明らかにされていない。

そこで、我々は細胞内のDAOタンパク質の動態を観察するために、DAOが高いレベルで発現しているブタ腎臓近位尿細管上皮細胞由来のLLC-PK₁細胞を用いて実験を行った。このLLC-PK₁細胞において種々の培養条件変更を行い、ウェスタンブロッティング法、DAO酵素活性測定、そして免疫細胞染色法により細胞内DAOタンパク質の存在量の変化を観察した。DAOと同様にペルオキシソームにターゲットされるカタラーゼをオルガネラ内の指標として用いた。さらに、細胞内タンパク質分解の2大システムであるユビキチン-プロテアソーム系そしてオートファジー系、それぞれの経路の探索のため阻害剤を用いた実験を行いDAOタンパク質の分解経路の解析を行った。

LLC-PK₁細胞におけるDAOタンパク質の存在量の変化を測定した結果、Trypsin/EDTA処理を行った細胞を再播種して培養すると播種後30分でDAOの存在量が約33.9%まで減少し、DAO酵素活性は約27.8%まで減少していることが分かった。さらに、LLC-PK₁細胞を栄養飢餓状態、さらにはより限定的なアミノ酸飢餓条件下で培養を行うと、この条件においてもDAOタンパク質の存在量およびDAO酵素活性の減少が観察された。同時に測定されたカタラーゼもDAOの変化と非常に似ていた。また、免疫細胞染色法では細胞内で点状に存在しているDAOがペルオキシソームのもう一つのマーカータンパク質であるABCD3と共に時間経過により点状シグナルが減弱することが明らかとなった。これら結果から、

LLC-PK₁細胞をアミノ酸飢餓条件下で培養することにより、DAOタンパク質の分解が誘導される可能性が考えられた。次に、我々はDAOタンパク質の分解経路を解析するためにアミノ酸飢餓条件下においてタンパク質分解阻害剤を添加する実験を行った。その結果、クロロキンを添加するとDAOタンパク質の分解が阻害されるが、一方、MG132を添加した条件では阻害されないことが分かった。さらに、アミノ酸飢餓下で阻害剤を添加した実験においてオートファジーのマーカであるLC3-IIの蓄積が観察された。これらの結果から、アミノ酸飢餓条件下のLLC-PK₁細胞ではオートファジーが誘導され、DAOタンパク質がこのシステムによって分解を受けていることが示唆された。また、新規タンパク質合成阻害剤でありオートファジーの阻害剤としても知られるシクロヘキシミドを添加する実験によってもDAO分解が阻害されたことから、飢餓時における細胞内DAO分解にはオートファジーが強く関わっていることが示唆された。

結論として、我々は LLC-PK₁ 細胞に発現している DAO が飢餓条件下において減少することを発見した。さらに我々はこの DAO タンパク質の分解はオートファジーを介した経路である可能性を強く示すことができた。これらの現象は腎臓の近位尿細管上皮細胞で起こっていることから、腎臓の病態生理学と DAO の潜在的な関わりを示唆する結果となったと考える。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1498 号	氏名	曾我部 浩史
審査委員	主査	米村 重信	
	副査	松本 満	
	副査	池田 康将	

題目 Dynamics of D-amino acid oxidase in kidney epithelial cells under amino acid starvation

(アミノ酸飢餓下の腎臓上皮細胞における D-アミノ酸酸化酵素の動態)

著者 Hirofumi Sogabe, Yuji Shishido, Hayato Miyazaki, Soo Hyeon Kim, Wanitcha Rachadech, Kiyoshi Fukui

令和3年発行 The Journal of Biochemistry に掲載予定

(主任教授 坂口末廣)

要旨 申請者らは腎臓の近位尿細管上皮細胞で高発現している D-アミノ酸酸化酵素 (D-amino acid oxidase; DAO) を研究の対象として、D 体のアミノ酸を特異的に代謝する本酵素の細胞内での動態を解析し、腎臓における病態生理学的意義の解明を目指した。DAO は近位尿細管で再吸収された D-アミノ酸の分解を介して血中 D-アミノ酸レベルの調節に関わり、急性腎障害においてはその発現レベルが減少することが知られている。今回、申請者らは、DAO 高発現細胞であるブタの近位尿細管由来上皮細胞 LLC-PK₁ を実験系に用い、ウエスタンブロットと酵素活性測定により DAO 分子の細胞内存在量の変化を測定し、免疫細胞染色により細胞内分布を観察した。得られた結果は以下の如くである。

1. 継代培養時に細胞内 DAO の存在量は減少し (30 分で約 34%)、18 時間まではこの現象が続いていた。

2. DAO の減少は Trypsin/EDTA 処理に由来すると考えられ、検討の結果、培地の栄養飢餓により引き起こされていた。さらに、より限定的なアミノ酸飢餓で DAO の減少が観察された。
3. アミノ酸飢餓下の DAO 減少への細胞内蛋白質分解システムの寄与を明らかにする目的で、阻害剤の添加実験を行なった結果、オートファジー経路の阻害剤クロロキンあるいはバフィロマイシン A1 による抑制を観察したことより、オートファジーによって分解されると結論づけられた。このことはこの細胞でアミノ酸飢餓による LC3-II の蓄積からも支持された。
4. 免疫細胞染色の実験から、DAO と共局在するペルオキシソームマーカー ABDC3 のシグナルが同時に減弱することから、ペキソファジーである可能性が示された。
5. シクロヘキシミドが新規蛋白質合成阻害とともにオートファジー阻害効果を有することから、シクロヘキシミドによる DAO 分解の抑制に、オートファジー阻害が寄与することが示唆された。

本研究は、腎臓近位尿細管上皮細胞における DAO の動態解析から、本酵素の分解経路を明らかにし、上皮細胞における栄養飢餓が DAO の分解を惹起することを示した。腎臓病の病態の理解に本酵素が有用であることを示唆する知見であり、学位授与に値すると判定した。