



Ubiquitin-dependent degradation of Smad2 is increased in the glomeruli of rats with anti-thymocyte serum nephritis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード: 作成者: 戸川, 証 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1260

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 407号	学位授与年月日	平成15年12月26日
氏名	戸川 証		
論文題目	Ubiquitin-dependent degradation of Smad2 is increased in the glomeruli of rats with anti-thymocyte serum nephritis (Smad2 のユビキチン依存性分解は抗胸腺細胞血清腎炎ラットの糸球体で亢進している)		

論文題目

Ubiquitin-dependent degradation of Smad2 is increased in the glomeruli of rats with anti-thymocyte serum nephritis

(smad2 のユビキチン依存性分解は抗胸腺細胞血清腎炎ラットの糸球体で亢進している)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Transforming growth factor (TGF)- β と Smad による細胞内のシグナル伝達は、病的な細胞外基質の沈着による腎の線維化の進展に関与することが知られている。しかし、腎疾患の進展の過程で、種々の Smad がどのように変化するかは不明である。本研究で我々は、抗胸腺細胞血清(anti-thymocyte serum: ATS)腎炎ラットの糸球体における Smad 蛋白の調節機構について検討した。

[材料ならびに方法]

Wistar ラットの胸腺を羊に免疫し、ATS を作成した。雄性 Wistar ラットに AIS を 0.5mL 経静脈的に投与し腎炎を惹起、0、3、4、5、6、7、14、28 日目に屠殺し、腎臓を摘出、一部を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、PAS 染色で組織を評価した。残りの腎臓から sieving 法を用いて糸球体を単離した。

24 時間蓄尿の蛋白濃度をピロガールレッド・モリブデン法で測定。

TGF- β 1 の測定: 単離糸球体の一部を RPMI 培地で 24 時間培養し、上清の TGF- β 1 を ELISA で測定した。

Western blot: 単離糸球体から RIPA バッファーを用い蛋白を抽出、Smad2、Smad3、Smad4、リン酸化 Smad2、Smurf2 を検討した。

RT-PCR: 単離糸球体より total RNA を抽出、逆転写後 Smad2、内部標準としてのリボソーム RNA(18S)をリアルタイム PCR 法で検討した。

蛋白分解アッセイ: 単離糸球体から TritonX バッファーを用い抽出した蛋白を、ATP、ユビキチンを含む反応バッファーに混合しプロテアソーム阻害剤存在下または非存在下で、37°C 6 時間反応させ、内因性の Smad2 の減少率を Western blot で検出、腎炎群と対照群で比較検討した。

ユビキチン活性の測定: リコンビナント Smad2、ATP、ユビキチン、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、糸球体抽出蛋白を含む反応液を 30°C30 分反応させ、Western blot でポリエビキチン化されたリコンビナント Smad2 を検出。0、3、5、7 日目の糸球体抽出蛋白について比較検討した。

[結果]

尿蛋白、組織所見: 蛋白尿は 3 日目をピークに一過性に増加し、28 日目までに徐々に正常化した。糸球体においてメサンギウム基質の増加とメサンギウム細胞の増殖は 7 日目をピークに認められ、その後徐々に改善した。

糸球体 TGF- β 1: 7 日目をピークに一過性の増加を認めた。

単離糸球体の Smad 蛋白の変化: Smad2 蛋白は 5-7 日目をピークに著明な減少を認めた。

Smad3、Smad4 の蛋白量は経過中変化がなかった。

単離糸球体の Smad2 mRNA の変化: Smad2 は 5-7 日目にかけて蛋白量が著明に減少したにもかかわらず、Smad2 mRNA は経過中、発現量に変化を認めなかった。

内因性 Smad2 蛋白の分解: 腎炎糸球体蛋白抽出液中の内因性 Smad2 は、対照群と比較し分解が亢進しており、この分解はプロテアソーム阻害剤で抑制された。

Smad2 に対するユビキチン活性: 腎炎糸球体抽出蛋白の、外因性 Smad2 蛋白に対するユビキチン活性は対照群と比較し亢進していた。

Smad2 の E3 ユビキチンリガーゼである Smurf2 は 5 日目をピークに増加していた。

[考察]

当研究において、我々は TGF- β と細胞外基質の沈着がピークとなる ATS 腎炎ラットの、糸球体における TGF- β シグナル伝達物質 Smad の変化を検討し、以下の結果を得た。

1. Smad2 蛋白は Smad3、Smad4 蛋白と比較し著しく減少していることが明らかとなった。

この Smad2 の減少機序について検討し、以下の 2-4 の結果を得た。

2. 糸球体の Smad2 mRNA 発現は ATS 腎炎の経過中著明な変化を認めなかった。すなわち Smad2 蛋白の減少は、遺伝子発現以後の機構によることが示唆された。

3. 糸球体抽出蛋白の内因性 Smad2 の分解は、腎炎惹起後著明に亢進していた。糸球体抽出蛋白、リコンビナント Smad2、ATP、ユビキチンを混合し反応させ、SDS-PAGE、Western blot でポリユビキチンを検出するユビキチン活性の測定では、腎炎糸球体抽出蛋白において Smad2 に対するユビキチン活性の亢進が認められた。

4. Smad2 の E3 ユビキチンリガーゼである Smurf2 蛋白の腎炎糸球体 5 日目における発現亢進が認められた。

以上より ATS 腎炎糸球体において、Smad2 蛋白は Smurf2 の増加に伴いユビキチン-プロテアソーム系により選択的に分解され、そのために Smad2 蛋白が減少していることが示唆された。すなわち腎炎の経過中、ユビキチン-プロテアソーム系は、Smad2、Smad3 の量的なバランスを変化させ、TGF- β シグナリングに影響をおよぼしていると考えられた。

[結論]

Smad2 のユビキチン依存性分解は ATS 腎炎ラットの糸球体で亢進している。

論文審査の結果の要旨

申請者の論文は、申請者のグループ(第一内科、山本講師を中心とするグループ)が種々の腎炎モデルを用いて、transforming growth factor β (TGF β) を起点とする細胞内のシグナル伝達の変動がその病態にどのような影響を及ぼすかを検討してきた一連の研究のひとつであり、モデル自体はヒトの実際の症例との類似性についてそれほど大きな直接的応用性が現時点では不明であるものの、興味深い知見に新規の説得力のある解釈を加え、このシグナルを治療の標的とする将来の計画に合理性を付加するものである。

TGF β と Smad による細胞内のシグナル伝達は、病的な細胞外基質の沈着による腎の線維化の進展に関与することが知られている。しかし、腎疾患の進展の過程で、種々の Smad がどのように変化するかは不明であった。本研究で彼等はまず、抗胸腺細胞血清(anti-thymocyte serum: ATS)腎炎ラットの糸球体における Smad 蛋白の増減などをしらべ、さらにその調節機構について検討した。

〔材料ならびに方法〕

Wistar ラットの胸腺を羊に免疫し、ATS を作成した。雄性 Wistar ラットに ATS を 0.5mL 経静脈的に投与し腎炎を惹起、0、3、4、5、6、7、14、28 日目に屠殺し、腎臓を摘出、一部を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、PAS 染色で組織を評価した。残りの腎臓から sieving 法を用いて糸球体を単離した。24 時間蓄尿の蛋白濃度をピロガールレッド・モリブデン法で測定。

TGF- β 1 の測定: 単離糸球体の一部を RPM1 培地で 24 時間培養し、上清の TGF- β 1 を ELISA で測定した。

Western blot: 単離糸球体から RIPA バッファーを用い蛋白を抽出、Smad2、Smad3、Smad4、リン酸化 Smad2、Smurf2 を検討した。

RT-PCR: 単離糸球体より total RNA を抽出、逆転写後 Smad2、内部標準としてのリボソーム RNA(18S)をリアルタイム PCR 法で検討した。

蛋白分解アッセイ: 単離糸球体から TritonX バッファーを用い抽出した蛋白を、ATP、ユビキチンを含む反応バッファーに混合しプロテアソーム阻害剤存在下または非存在下で、37°C6 時間反応させ、内因性の Smad2 の減少率を Western blot で検出、腎炎群と対照群で比較検討した。

ユビキチン活性の測定: リコンビナント Smad2、ATP、ユビキチン、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、糸球体抽出蛋白を含む反応液を 30°C30 分反応させ、Western blot でポリユビキチン化されたリコンビナント Smad2 を検出。0、3、5、7 日目の糸球体抽出蛋白について比較検討した。

〔結果〕

尿蛋白、組織所見: 蛋白尿は 3 日目をピークに一過性に増加し、28 日目までに徐々に減少した。糸球体においてメサンギウム基質の増加とメサンギウム細胞の増殖は 7 日目をピークに認められ、その後徐々に改善した。特に、糸球体 TGF- β 1: 7 日目をピークに一過性の増加を認めたその原因の探求のひとつとして、下流蛋白の Smad 蛋白に注目した。すると単離糸球体の Smad2 蛋白の変化は 5-7 日目をピークに著明な減少を認めた。一方 Smad3、Smad4 の蛋白量は経過中変化がなかった。また、単離糸球体の Smad2 mRNA の変化をみると前述のように Smad2 は 5-7 日目にかけて蛋白量が著明に減少したにもかかわらず、Smad2 mRNA は経過中、発現量に変化を認めなかったのである。そこで、Smad2 の分解亢進という仮説をたてさらに次の実験をおこなった。腎炎糸球体蛋白抽出液中の内因性 Smad2 は、対照群と比較し分解が亢進しており、この分解はプロテアソーム阻害剤で抑制された。さらに、腎炎糸球体抽出蛋白の、外因性 Smad2 蛋白に対するユビキチン活性は対照群と比較し亢進していることをしめすことができた。これらの観察の解釈を補強するものとして Smad2 の E3 ユビキチンリガーゼである Smurf2 は 5 日目をピークに増加していた。また、前述の試験管内再構成実験つまり糸球体抽出蛋白、リコンビナント Smad2、ATP、ユビキチンを混合し反応させ、SDS-PAGE、Western blot でポリユビキチンを検出するユビキチン活性の測定では、腎炎糸球体抽出蛋白において Smad2 に対するユビキチン活性の亢進が認められた。申請者の以上の実験から得た新知見はまとめると以下のようになる。

1. Smad2 蛋白は Smad3、Smad4 蛋白と比較し著しく減少していること。
2. この Smad2 の減少機序については:

- 1) 糸球体の Smad2 mRNA 発現は ATS 腎炎の経過中著明な変化を認めなかった。すなわち Smad2 蛋白の減少は、遺伝子発現以後の機構によること。
- 2) 糸球体抽出蛋白の内因性 Smad2 の分解は、腎炎惹起後著明に亢進していて、in vitro の再構成実験でも Smurf2 によるユビキチン分解系が機能すること。
- 3) Smad2 の E3 ユビキチンリガーゼである Smurf2 蛋白の腎炎糸球体 5 日目における発現亢進からも上記の仮説が支持されること。

の 3 点が明らかになったことである。

以上より結論として ATS 腎炎糸球体において、Smad2 蛋白は Smurf2 の増加に伴いユビキチン-プロテアソーム系により選択的に分解され、そのために Smad2 蛋白が減少していることが示唆された。すなわち腎炎の経過中、ユビキチン-プロテアソーム系は、Smad2、Smad3 の量的なバランスを変化させ、TGF- β シグナリングに影響をおよぼしていると主張した。

本研究について審査委員会では以下の試問を行った。

- 1) 腎の間質といっているがどこをさすのか
- 2) smad タンパクの腎における局在
- 3) Thy1 腎炎とヒト腎炎との異同
- 4) 用いた抗体の評価はどのようにするのか
- 5) Mesangiolysis の過程はどのようなものか
- 6) Western blot を行うさいのタンパク溶解液の組成とその影響について
- 7) ユビキチン化には Smad2 のリン酸化が必須か
- 8) なぜ Wistar 系ラットを用いるのか
- 9) これらの現象は腎臓のどの細胞のなかで起きているのか

これらに対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	相村春彦	
	副査	大園誠一郎	副査 渡邊裕司