

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591350

研究課題名(和文) 肝臓特異的 O 結合型糖修飾転移酵素欠損マウスの、果糖摂取による代謝異常への影響

研究課題名(英文) The impact of altered O-GlcNAcylation on fructose-derived metabolic derangements due to deletion of O-GlcNAc transferase in the hepatocytes.

研究代表者

関根 理 (Sekine, Osamu)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：00402719

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)：細胞内代謝経路のヘキソサミン経路を介したO-結合型糖修飾(O-GlcNAc)は栄養素により活性化される。

本研究では、果糖過剰摂取による肝臓における細胞内蛋白のO-GlcNAc修飾の調節異常を介した代謝異常への影響に着目した。マウス系統間での果糖摂取による肝臓でのO-GlcNAc修飾核内蛋白の発現量が、脂肪肝や代謝異常と関連していた。転移酵素O-GlcNAc transferase(OGT)遺伝子の肝臓特異的ノックアウトモデルマウスは、O-GlcNAc修飾蛋白の発現が減少し、組織学的に肝細胞障害や偽胆管の形成、線維化を著明に認めており、OGTが細胞の恒常性を保つのに重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：O-GlcNAcylation is characterized by the addition of O-linked -N-acetylglucosamine to proteins and serves as an intracellular nutrient sensor for modulating cell functions. O-GlcNAc transferase (OGT) is a critical enzyme for O-GlcNAcylation. We found out that protein O-GlcNAcylation and expression of OGT was increased in the liver fed a high-fructose diet compared to a control diet related to elevation of the lipogenesis and metabolic disorders, associating to the susceptibility to high-fructose diet.

To examine the physiological role of O-GlcNAcylation in hepatocyte biology, hepatocyte-specific OGT-deleted mice (Ogt-KO) were generated by crossbreeding Ogt-flox mice with Albumin-Cre mice. Ogt-KO showed severe hepatocellular damage, proliferation of bile ducts and fibrosis. Our results suggest that protein O-GlcNAcylation is a key modulator for nutrient-derived metabolism in the liver, and tuning of OGT-mediated protein O-GlcNAcylation is essential to maintain hepatocyte homeostasis.

研究分野：代謝学

キーワード：O-GlcNAc修飾 肝臓 果糖 糖・脂質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの発症人口が増加していることが問題となっており、過栄養や食事バランスの不均衡が肥満や内臓脂肪の蓄積、糖代謝異常や脂質代謝異常に大きく影響している。特に肝臓においては脂肪肝や脂肪肝炎を生じていることが多い。我々はこれまでに、清涼飲料水などに多く含まれている果糖の過剰摂取が肥満や耐糖能異常を惹起し、肝臓での脂質合成系遺伝子の転写因子 SREBP-1c の発現上昇を介して糖・脂質代謝を悪化させることを、果糖摂取マウスを用いた実験にて明らかにしてきた (J Biol Chem. 279:29031,2004)。

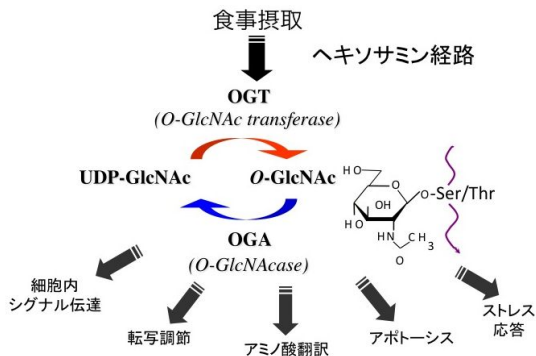


図1 食事摂取によるヘキサミン経路を介した細胞内蛋白のO-GlcNAc修飾

我々は核内蛋白の翻訳後修飾の重要性を明らかにしつつある。細胞内代謝経路のヘキサミン経路が栄養素により活性化を受け、その最終産物UDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) が単糖として蛋白とO-結合する (O-結合型糖修飾: O-GlcNAc)。O-GlcNAc修飾には、転移酵素O-GlcNAc transferase (OGT) および解離酵素O-GlcNAcase (OGA) の2つの修飾酵素により調節されており (図1) これらの酵素の調節異常が糖尿病や代謝異常と関連性が高いことが話題となっている。最近我々はショウジョウバエの脳に存在するインスリン分泌細胞におけるこれらO-GlcNAc修飾酵素の遺伝子をノックダウンさせたところ、インスリンの産生量や末梢組織でのインスリンの感受性が変化していると報告した (J Biol Chem. 285:38684, 2010)。

また、果糖過剰摂取マウスは対象食マウスと比較して、食事摂取による肝臓でのO-GlcNAc修飾核内蛋白の発現量が増加しており、OGTの遺伝子発現量が亢進しており、OGAの遺伝子発現量が減少していた。そして、我々は肝臓特異的OGT遺伝子ノックアウトモデルマウスを作成させることに成功している。

2. 研究の目的

食事摂取によりこれらのO-GlcNAc調節酵素が互いにバランスよく調節し合うことが、糖・脂質代謝の恒常性を保たせるのに重要であり、果糖過剰摂取などの食事バランスの不

均衡により、これらO-GlcNAc調節酵素の調節異常を来すものと推測している。

そこで、肝臓において細胞内蛋白のO-GlcNAc修飾を介した糖・脂質代謝異常の機構を明らかにさせるために以下の研究を行った。

(1) 果糖摂取による肝臓でのO-GlcNAc修飾核内蛋白の発現量やヘキサミン経路の活性などについて、マウス系統間に違いがあるかを検討した。

(2) 肝臓特異的OGT遺伝子ノックアウトモデルマウスにおける、糖・脂質代謝への影響を検討した。

(3) 肝臓特異的OGT遺伝子ノックアウトモデルマウスにおける、肝臓での組織学的変化を評価し、肝細胞障害の機構などを検討した。

(4) 肝臓特異的OGTノックアウトモデルマウスの初代培養肝細胞において、果糖投与によるO-GlcNAc蛋白の発現パターンの変化や脂質合成系酵素遺伝子発現への影響を検討する。

(5) 肝臓特異的OGTノックアウトマウスの肝臓での遺伝子発現の変化を、マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 各4週令の、果糖摂取により糖・脂質代謝異常を来しやすい系統のCBA/JNマウスと果糖低反応性のDBA/2Nマウスに対して、高果糖食 (カロリー比率: 炭水化物 63.4% {うち果糖が95%}、蛋白質 22.44%、脂質 14.52%) 群と対象食 (カロリー比率: 炭水化物 58.3%、蛋白質 29.3%、脂質 12.6%) の2群に分けて4週間飼育させた (オリエンタル酵母工業)。一晩絶食後2時間摂食させ、それぞれのマウスより肝臓を摘出、核蛋白を抽出した。SDS-PAGEにて蛋白を泳動後Western blot法にてO-GlcNAc修飾蛋白抗体 (RL2抗体) を用いて、肝臓核内におけるO-GlcNAc修飾蛋白の発現の変化を検討した。また、摘出肝臓よりtotal RNAを抽出し逆転写酵素を用いてcDNAを作成し、脂質合成系遺伝子やヘキサミン経路の調節遺伝子及びO-GlcNAc修飾調節遺伝子の発現についてreal-time PCR法を用いて評価した。

(2) OGT遺伝子floxedマウス (129S1/SvJ background, Jackson Laboratory社) にはOGT遺伝子のExon1を含む領域がCre recombinase認識配列であるloxP領域により挟まれており、Cre recombinaseの作用にてExon1を含む領域を欠損させることにより、臓器特異的ノックアウトモデルを作成させることができる。OGT遺伝子floxedマウスとアルブミンプロモーターの働きにより肝臓で特異的にCre recombinaseが誘導されるCre recombinase発現マウスとを交配させ、Cre-loxPシステムを用いて肝臓特異的OGT遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを作成した。

各 10~12 週令の肝臓特異的 OGT 遺伝子ノックアウトマウス、および対照マウスにおける糖代謝の検討として、7 時間絶食後に腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) (ブドウ糖 1g/kgBW) や腹腔内インスリン負荷試験 (IPITT) (レギュラーインスリン 0.5 単位/kgBW)、腹腔内ピルビン酸負荷試験 (IPPTT) (ピルビン酸ナトリウム 2g/kgBW) などを行った。

(3) 各 4 週令の肝臓特異的 OGT 遺伝子ノックアウトマウス、および対照マウスに高果糖食または対照食を 8 週間投与し、肝臓から RNA および核蛋白を抽出して、OGT 遺伝子欠損状態における OGT 発現の状態や O-GlcNAc 修飾蛋白の状態について mRNA を用いた real-time PCR 法や Western blot 法にて確認した。

肝臓における組織学的な検討として、摘出した肝臓をホルマリン固定後にパラフィン包埋を行い、HE 染色や Azan 染色などを行った。

肝障害への検討として、下大静脈から血液を採取し、血清を分離した後にトランスアミナーゼ値を測定した (和光純薬工業)。酸化ストレスマーカーや繊維化マーカーなどの発現状態について、mRNA を用いた real-time PCR 法や Western blot 法にて確認した。

(4) OGT 遺伝子 floxed マウスおよび対象マウスの門脈よりコラゲナーゼを用いて還流を行い、摘出した肝臓より初代肝細胞を単離培養させた。培養 3 時間後に Cre recombinase 発現アデノウイルスを感染 (10pfu/cell) させ、肝細胞に対して OGT 遺伝子を欠損させる試みを行った。感染 24 時間後に初代培養肝細胞に対して 25mM の果糖を 6 時間投与した後に RNA や核蛋白を抽出、OGT 遺伝子欠損状態における OGT 発現の状態や O-GlcNAc 修飾蛋白の状態について mRNA を用いた real-time PCR 法や Western blot 法にて確認した。

(5) OGT 遺伝子 floxed マウスおよび対象マウスから単離培養した初代肝細胞に Cre recombinase 発現アデノウイルスを感染 (10pfu/cell) させ、感染 24 時間後に肝細胞を回収した。肝臓特異的 OGT ノックアウトマウスの肝臓での遺伝子発現の変化を、マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析を行った。

4. 研究成果

(1) CBA/JN マウスでは DBA/2N マウスと比較して、高果糖食による肝臓内 SREBP-1c の遺伝子発現、標的遺伝子 FAS の発現の亢進や、血中中性脂肪値及びインスリン値の上昇を認めた。高果糖食群における肝臓核内 O-GlcNAc 修飾蛋白の種類や発現量が増加していた。高果糖食による肝臓内 OGT 遺伝子発現が亢進していた。肝臓内ヘキサミン

経路の律速酵素 glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (GFAT) 1 遺伝子発現が亢進していた。

果糖摂取による、肝臓内でのヘキサミン経路や O-GlcNAc 修飾の調節異常が、マウス系統間で差異を認めており、マウス系統間での糖・脂質代謝異常の差異に関連していることが示唆された。

(2) 糖代謝への検討として IPGTT や IPITT、IPPTT を行ったところ、肝臓特異的 OGT ノックアウトマウスは対照マウスと比較して、負

肝臓特異的 OGT ノックアウトマウスを用いた検討

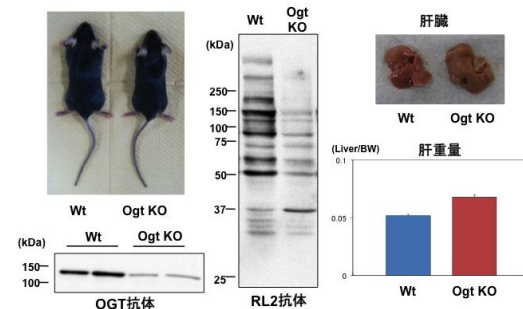


図2 O-GlcNAc 修飾蛋白の発現が減少しており、体長が小さいにもかかわらず、肝重量が大きかった。

荷後の血糖値に変化を認めなかった。

(3) 肝臓特異的 OGT ノックアウトマウスは対照マウスと比較して、肝臓における OGT や O-GlcNAc 修飾蛋白の発現が減少しており、体長や脂肪重量が小さいにもかかわらず、肝重量が大きいう特徴が認められていた (図 2)。組織学的な検討にて、肝細胞壊死や炎症細胞の浸潤、偽胆管の形成や線維化など、肝細胞障害を著明に認めていた (図 3)。これらの変化は、通常食よりも高果糖食摂取において、より顕著であった。また、血清トランス

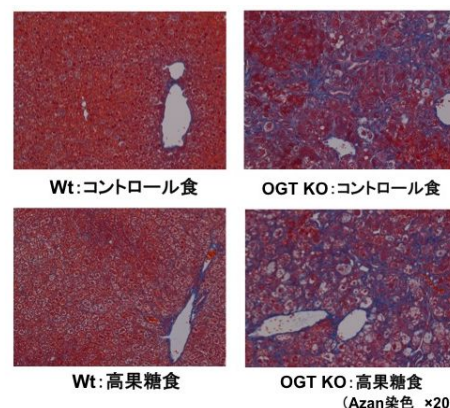


図3 肝臓特異的 OGT ノックアウトマウスでは、肝細胞障害および偽胆管形成や細胞周囲の繊維化が著明であり、高果糖食でより顕著であった。

アミナーゼ値が著明に上昇していた。

肝臓組織から抽出した cDNA より定量的 PCR 法を行ったところ、炎症 (TNF) や線維化 (1 型コラーゲン) および酸化ストレス

(gp91phox や p47phox) に関連する遺伝子の発現が増加していた。また、胆管形成の指標となる cytokeratin-19 の蛋白発現は、Western blot 法および免疫組織化学法にて上昇を認めた (図 4)。

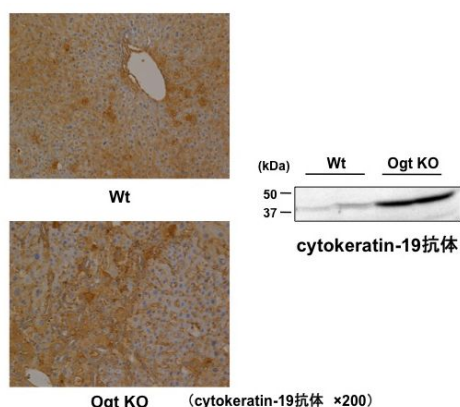


図4 肝臓特異的OGTノックアウトマウスでは、肝臓内のcytokeratin-19発現が上昇していた。

これらのことは、肝細胞での OGT 欠損状態により細胞内での恒常性が保てなくなること、肝細胞障害からアポトーシスなどの肝細胞死を招き、肝芽細胞から肝細胞への再生に対して OGT 欠損により機能しなくなること、胆管上皮細胞への分化が主体となることで偽胆管が豊富に形成され、一連の過程で炎症や繊維化、酸化ストレスが関与しているものと推察された。

週令ごとの検討を行ったところ、離乳前 (生後 3 週) では OGT 遺伝子の発現は低下していたものの、組織学的な変化は認めておらず、離乳後より肝障害が発生し進行していることが判明した。

(4) OGT 遺伝子 floxed マウスからの初代培養肝細胞に対して、Cre recombinase 発現アデノウイルスを感染させたところ、O-GlcNAc 修飾蛋白の発現や OGT 遺伝子の発現および OGA 遺伝子発現が減少していることを確認できた。

対象マウスからの初代培養肝細胞に対して、果糖投与は O-GlcNAc 修飾蛋白の発現が増加していた。また、果糖投与は OGT 遺伝子発現の上昇や OGA 遺伝子発現の減少している傾向が見られた。

(5) 肝臓特異的 OGT ノックアウトマウスの肝臓での遺伝子発現の変化を、マイクロアレイを用いて解析を行った。遺伝子オントロジー (GO; gene ontology) 解析にて、遺伝子発現変動比 (Fold Change) の絶対値が 2 より上であった 742 プローブのうち、422 個が遺伝子として認識されるものであった。一方、遺伝子発現カスケード解析にて、遺伝子発現変動比 (Fold Change) の絶対値が 3.5 より上であった 175 個の遺伝子と、発現に変動がなかった 882 個の遺伝子が認められた。

今後はこれらの結果より、有意に多く結合部

位が推定される転写因子群やカスケード解析などを詳細に行っていく予定である。

<引用文献>

1. Sekine O, Love D, Rubenstein D, Hanover J: Blocking O-GlcNAc cycling in *Drosophila* insulin-producing cells perturbs glucose-insulin homeostasis. *J Biol Chem.* 2010 Dec 3;285(49):38684-91

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Kondo K, Ishikado A, Morino K, Nishio Y, Ugi S, Kajiwara S, Kurihara M, Iwakawa H, Nakao K, Uesaki S, Shigeta Y, Imanaka H, Yoshizaki T, Sekine O, Makino T, Maegawa H, King GL, Kashiwagi A. A high-fiber, low-fat diet improves periodontal disease markers in high-risk subjects: a pilot study. *Nutr Res.* 2014 Jun;34(6):491-8. 査読有

2. Kondo K, Morino K, Nishio Y, Kondo M, Nakao K, Nakagawa F, Ishikado A, Sekine O, Yoshizaki T, Kashiwagi A, Ugi S, Maegawa H. A fish-based diet intervention improves endothelial function in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus: a randomized crossover trial. *Metabolism.* 2014 Jul;63(7):930-40. 査読有

3. Nakagawa F, Morino K, Ugi S, Ishikado A, Kondo K, Sato D, Konno S, Nemoto K, Kusunoki C, Sekine O, Sunagawa A, Kawamura M, Inoue N, Nishio Y, Maegawa H. 4-Hydroxy hexenal derived from dietary n-3 polyunsaturated fatty acids induces anti-oxidative enzyme heme oxygenase-1 in multiple organs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jan 17;443(3):991-6. 査読有

4. Ugi S, Maeda S, Kawamura Y, Kobayashi MA, Imamura M, Yoshizaki T, Morino K, Sekine O, Yamamoto H, Tani T, Rokushima M, Kashiwagi A, Maegawa H. CCDC3 is specifically upregulated in omental adipose tissue in subjects with abdominal obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2013 Oct 12. 査読有

5. Ishikado A, Morino K, Nishio Y, Nakagawa F, Mukose A, Sono Y, Yoshioka N, Kondo K, Sekine O, Yoshizaki T, Ugi S, Uzu T, Kawai H, Makino T, Okamura T, Yamamoto M, Kashiwagi A, Maegawa H. 4-Hydroxy hexenal derived from docosahexaenoic acid protects endothelial cells via Nrf2 activation. *PLoS One.* 2013 Jul 23;8(7):e69415. 査読有

6. Ushio M, Nishio Y, Sekine O, Nagai Y,

Maeno Y, Ugi S, Yoshizaki T, Morino K, Kume S, Kashiwagi A, Maegawa H. Ezetimibe prevents hepatic steatosis induced by a high-fat but not a high-fructose diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Jul 15;305(2):E293-304. 査読有

7. Kusunoki C, Yang L, Yoshizaki T, Nakagawa F, Ishikado A, Kondo M, Morino K, Sekine O, Ugi S, Nishio Y, Kashiwagi A, Maegawa H. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jan 4;430(1):225-30. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

1. 関根 理、他 Docosahexaenoic acid の血管平滑筋細胞への作用 第 45 回日本動脈硬化学会 平成 25 年 7 月 18 日 東京

2. 関根 理、他 当院外来患者におけるエゼチミブ投与の効果の検証-スタチン系薬剤との比較- 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 平成 25 年 5 月 16 日 熊本

3. 関根 理、他 マウス系統間で、果糖摂取による肝臓内核蛋白の O-結合型糖修飾の機構に差異を認める 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 平成 24 年 5 月 19 日 横浜

〔図書〕(計 1件)

1. 関根 理、柏木 厚典 フルクトースと生活習慣病 ホルモンと臨床 医学の世界社 59 巻 No.8 2011 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

滋賀医科大学 糖尿病・腎臓・神経内科
<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmed3/snai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 理 (Sekine Osamu)
滋賀医科大学 医学部 助教
研究者番号：00402719

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：