

氏 名 村田 幸一郎

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第806号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 平成30年 3月 9日

学 位 論 文 題 目 Lack of O-GlcNAcylation Enhances Exercise-Dependent
Glucose Utilization Potentially through AMP-activated
Protein Kinase Activation in Skeletal Muscle

(骨格筋における O-GlcNAc 修飾の低下は AMPK 活性化を介して運動依存性の糖利用を亢進させる)

審 査 委 員 主査 教授 扇田 久和

副査 教授 一杉 正仁

副査 教授 伊藤 俊之

論 文 内 容 要 旨

※整理番号	813	(ふりがな) 氏 名	むらた こういちろう 村田 幸一郎
学位論文題目	Lack of O-GlcNAcylation Enhances Exercise-Dependent Glucose Utilization Potentially through AMP-activated Protein Kinase Activation in Skeletal Muscle (骨格筋における O-GlcNAc 修飾の低下は AMPK 活性化を介して運動依存性の糖利用を亢進させる)		
<p>【目的】</p> <p>細胞機能制御の一端を担う翻訳後修飾の一つに O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) 修飾がある。O-GlcNAc 修飾は、ブドウ糖の代謝により生成された Fructose-6-phosphate の一部がヘキソサミン生合成経路に流入後の代謝産物である UDP-GlcNAc を基質とし、O-GlcNAc transferase (OGT) により serine/threonine 残基に付加される修飾である。高血糖による過剰な UDP-GlcNAc 産生は O-GlcNAc 修飾を増やすため、O-GlcNAc 修飾は細胞内エネルギー過剰のセンサーとしてインスリン抵抗性との関与が報告されている。一方、細胞内エネルギー枯渇のセンサーとして AMP-activated protein kinase (AMPK) があり、運動は AMPK を活性化することが知られている。本研究では骨格筋の糖代謝における O-GlcNAc 修飾の役割を、インスリン依存性経路だけでなく、AMPK 依存性経路についても着目して検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>① 通常食摂取下にて骨格筋における O-GlcNAc 修飾が糖代謝に及ぼす影響の検討</p> <p>Ogt-flox マウスと骨格筋特異的 Mlc1f-Cre 発現マウスを交配し、骨格筋特異的 Ogt 欠損マウス (Ogt-MKO) を作製した。Western Blot (WB) 法で OGT および O-GlcNAc 修飾蛋白を認識する RL2 抗体を用いて修飾蛋白量の減弱を確認した。20 週齢で体重測定、腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT)、腹腔内インスリン負荷試験 (IPITT) を行い、IPITT 後の骨格筋を採取し、WB 法でインスリンシグナル伝達を示す Akt のリン酸化を評価した。次に、運動の影響を Rota-rod を用いて検討した。既報の通り最大許容速度の 50% の速度で 20 分間の運動負荷を与え、運動前後の血糖を測定し、運動前後の骨格筋で AMPK 活性化を示す ACC のリン酸化と AMPK 蛋白発現を評価した。また、AMPK 活性化剤である AICAR の腹腔内投与を行い、同様の検討を行った。</p> <p>② 高脂肪食摂取下および通常食摂取の加齢状態にて O-GlcNAc 修飾が糖代謝に及ぼす影響の検討</p> <p>16 週齢から高脂肪食を摂取させ、体重、血糖、血清インスリンを経時的に測定し、20 週齢で IPGTT を行った。次に、Euglycemic-clamp 法を用いて、より詳細にインスリン感受性を評価した。高脂肪食摂取下においても、WB 法で AMPK 蛋白発現を検討した。また、通常食摂取下の加齢状態での評価として、12-13 月齢で体重、体組成を測定し、代謝ケージを用いて活動量やエネルギー消費を評価した。慢性運動が与える影響を検討するため 13 週齢から回転かご付きケージで飼育した 12-13 月齢の対照群お</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2 千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

よび Ogt-MKO での検討を加えて、通常食摂取下の加齢状態での AMPK 蛋白発現を調べた。

③ C2C12 筋芽細胞における O-GlcNAc 修飾が糖代謝に及ぼす影響の検討

C2C12 筋芽細胞で Ogt 遺伝子を siRNA でノックダウンし、WB 法で OGT および RL2 抗体を用いて修飾蛋白量の減弱を確認した。Ogt ノックダウンでの AMPK 蛋白発現を評価し、2-deoxyglucose uptake 測定での糖取り込みの検討と、Cell Flux 解析にてブドウ糖酸化の評価を行った。

【結果】

① 通常食摂取下にて骨格筋における O-GlcNAc 修飾が糖代謝に及ぼす影響の検討

Ogt-MKO は安静状態での IPGTT で僅かではあるが有意な耐糖能の改善を示すも、IPITT では差がなく、IPITT 後に採取した骨格筋の Akt リン酸化の程度にも差を認めず、通常食摂取下のインスリン感受性には大きな影響を与えなかった。次に AMPK 依存性経路として Rota-rod を用いた運動負荷を行うと、対照群に比して Ogt-MKO は有意に運動後の血糖が低値であり、運動後に AMPK のリン酸化が亢進傾向となり、AMPK 活性化を示す ACC のリン酸化が有意に亢進していた。さらに AMPK 活性化剤である AICAR の腹腔内投与により Ogt-MKO では顕著な血糖低下を来した。Ogt-MKO で AMPK 蛋白発現が増加しており、これが AMPK 活性化の機序と考えられた。

② 高脂肪食摂取下および通常食摂取の加齢状態にて O-GlcNAc 修飾が糖代謝に及ぼす影響の検討

Ogt-MKO は高脂肪食摂取下の体重増加の抑制、空腹時血糖低値および血清インスリン低値を示した。IPGTT 中の血糖および血清インスリンも低値で推移した。Euglycemic-clamp 法で全身のインスリン感受性が亢進しており、臓器別評価にて肝臓および骨格筋のインスリン感受性亢進を確認した。通常食摂取下でも加齢状態 (12-13 月齢) では Ogt-MKO で体重および脂肪重量が減少しており、代謝ケージにて高いエネルギー摂取量および低い活動量にも関わらずエネルギー消費が亢進していた。高脂肪食摂取下と加齢状態ともに、Ogt-MKO で AMPK 蛋白発現の増加が確認され、また、回転かご付きケージでの慢性運動は対照群および Ogt-MKO ともに AMPK 蛋白発現を増加させる傾向にあった。

③ C2C12 筋芽細胞における O-GlcNAc 修飾が糖代謝に及ぼす影響の検討

C2C12 筋芽細胞で Ogt ノックダウンを行うと、AMPK 蛋白発現の増加が観察された。同時に糖取り込みの増加と、ブドウ糖酸化の亢進を確認した。また、Cell Flux 解析においてエネルギー消費につながる Proton leak が、Ogt ノックダウンで増加した。

【考察】

今回の検討で、*in vivo* および *in vitro* ともに骨格筋における O-GlcNAc 修飾の低下は AMPK 蛋白発現を増加させ、運動依存性の糖利用の亢進が認められた。通常食摂取下ではインスリン感受性に影響を与えなかったが、高脂肪食摂取下では O-GlcNAc 修飾の低下がインスリン感受性の亢進を示した点は、体重増加の抑制に伴う二次的な影響と考えられた。回転かご付きケージでの慢性運動でも AMPK 蛋白発現が増加する傾向にあったことから、O-GlcNAc 修飾の低下は慢性運動の効果を模倣し、抗糖尿病・抗肥満作用を示す可能性が示唆された。

【結論】

骨格筋における O-GlcNAc 修飾の低下は AMPK 活性化を介して運動依存性の糖利用を亢進させる。

学位論文審査の結果の要旨

整 理 番 号	813	氏 名	村田 幸一郎
論 文 審 査 委 員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成)</p> <p>骨格筋での糖代謝におけるタンパク質への <i>O</i>-結合型 <i>N</i>-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 付加修飾の役割について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 骨格筋特異的に O-GlcNAc 転移酵素 (Ogt) を欠失させた (Ogt-MKO) マウスでは、通常食摂取下で安静時のインスリン感受性に著明な変化は見られなかった。 2) 通常食摂取下で運動負荷をかけたところ、対照群と比較して Ogt-MKO マウスでは、運動負荷後の血糖値が低下し、AMPK の発現が増加すると共に、AMPK の基質であるアセチル CoA カルボキシラーゼのリン酸化が増加した。また、AMPK 活性化剤の投与により血糖値は著明に低下した。 3) 高脂肪食摂取下で、対照群と比較して Ogt-MKO マウスの体重増加は抑制され、空腹時血糖値も低下した。全身、特に、肝臓と骨格筋でインスリン感受性が亢進した。 4) 通常食摂取下の加齢状態でも Ogt-MKO マウスの体重および脂肪重量は減少し、エネルギー消費は亢進した。AMPK の発現も増加した。 5) C2C12 筋芽細胞で Ogt をノックダウンしたところ、AMPK の発現は増加し、糖取り込みも増加した。また、ミトコンドリアでの代謝亢進による酸素消費量と細胞外へのプロトンリークが増加した。 <p>以上より、本論文は骨格筋で Ogt によるタンパク質への O-GlcNAc 付加修飾が AMPK を介して糖代謝に影響を及ぼすことを個体、細胞および分子レベルで解明したものである。さらに、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 595 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 30 年 1 月 29 日)</p>			