

令和元年5月12日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09744

研究課題名(和文) 骨格筋におけるO-GlcNAc修飾の糖代謝に与える影響

研究課題名(英文) The role of O-GlcNAcylation in the Glucose metabolism in Skeletal Muscle

研究代表者

森野 勝太郎 (Morino, Katsutaro)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90444447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内でどれだけ栄養素を必要とするかを検知するメカニズムを栄養センサーと呼ぶ。私たちは、解糖系から枝分かれするヘキソサミン経路が骨格筋において栄養センサーとして働いているかどうかを、O-GlcNAc transferase(Ogt)と呼ばれるたんぱく質の糖鎖修飾に関わる遺伝子を骨格筋でノックアウトする事で検討しました。その結果、Ogtの骨格筋をノックアウトしたマウスではAMP依存性キナーゼと呼ばれる運動で活性化する酵素の発現量を増やすことで、糖取り込みを亢進させることを発見しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、O-GlcNAc修飾が骨格筋で起こらなくなると、血糖が低下し、体重が減少する事が分かった。Ogtノックアウトマウスは少なくとも1歳を超えて元気に過ごしており、目立った臓器障害も観察されなかったことから、糖尿病や肥満の新規治療ターゲットになる可能性がある。しかしながら、他の研究で脂肪細胞や膵細胞でO-GlcNAc修飾がなくなると臓器障害を来して言うことから、骨格筋だけに薬剤が吸収されるようなドラッグデリバリー技術との組み合わせが必要となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：O-GlcNAcylation is a post-translational modification that is characterized by the addition of N-acetylglucosamine(GlcNAc) to proteins by O-GlcNAc transferase (Ogt). The degree of O-GlcNAcylation is thought to be associated with glucotoxicity and diabetic complications, because GlcNAc is produced by a branch of the glycolytic pathway. However, its role in skeletal muscle has not been fully elucidated. In this study, we created skeletal muscle-specific Ogt knockout (Ogt-MKO) mice and analyzed their glucose metabolism. During an intraperitoneal glucose tolerance test, blood glucose was slightly lower in Ogt-MKO mice than in control Ogt-flox mice. High fat diet-induced obesity and insulin resistance were reversed in Ogt-MKO mice. In addition, 12-month-old Ogt-MKO mice had lower body mass with increased AMP-activated protein kinase a (AMPKa) protein expression. In conclusion, loss of O-GlcNAcylation facilitates glucose utilization in skeletal muscle, potentially through AMPK activation.

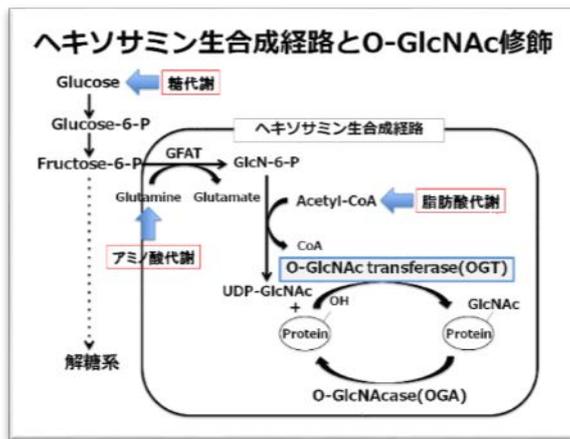
研究分野：糖尿病・肥満症

キーワード：骨格筋 AMPK 糖代謝 加齢 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は機能的役割により、瞬間的で強い収縮力を有する白筋と、持続的運動が可能でミトコンドリアに富んだ赤筋に分類される。筋細胞への分化は転写因子 MyoD が担っているが、最終的に赤筋・白筋に分化するメカニズム (ファイバータイプ決定) については不明な点も多い。骨格筋に流入する栄養素自体が、どの様なメカニズムでファイバータイプや骨格筋内の糖代謝・脂肪代謝を調節するのか不明である。



そこで我々はヘキソサミン合成経路に注目した。左図に示すように、細胞内に流入したブドウ糖の一部 (1~3%程度) はアミノ酸であるグルタミンとの反応によりグルコサミンとなり、脂肪酸酸化の産物である Acetyl-CoA と反応しウリジン 2 リン酸-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) となる。過栄養状態で生成した UDP-GlcNAc は O-GlcNAc transferase (OGT) により種々のタンパク質の Ser/Thr 残基を posttranslational に調節する事から栄養センサーとして働いていることが示唆されている。

一方、AMPK は細胞内の ATP 低下を反映して活性化され、栄養枯渇状態に対する応答反応の中心的役割を担っている。AMPK は Ser/Thr キナーゼである事から、過栄養と栄養枯渇状態のクロストークは AMPK の標的残基で起こっている可能性がある。また、O-GlcNAc 修飾の標的として、FOXO1、Sp1、PGC1 の様な転写因子が報告されており、遺伝子発現を介した調節の可能性も想定した。

2. 研究の目的

骨格筋を質的・量的に良好に保つことは、糖尿病・加齢に伴う筋萎縮 (サルコペニア) の治療・予防に重要である。骨格筋は機能的に、強い収縮力を有する白筋と、ミトコンドリアが豊富で持続的運動が可能で赤筋に分類される。骨格筋ミトコンドリア量の調節は、基礎代謝量のみならず、糖・脂質代謝にも関与することが知られている。細胞内栄養状態の枯渇は AMPK やオートファジーを介して調節されているが、細胞内栄養状態の飽和についての研究は報告が少ない。糖質や脂質の流入量により調整される O-GlcNAc 修飾が骨格筋の糖代謝・脂質代謝、ミトコンドリア量調節に関与するかどうかを検討することにより、糖尿病・肥満症・加齢に伴う筋萎縮 (サルコペニア) の病態生理について探求したい。

3. 研究の方法

骨格筋特異的 Ogt ノックアウトマウスの糖代謝を検討する。

骨格筋特異的 Ogt ノックアウトマウス (OGT-MKO) は Cre-LoxP システムにより作成した。本マウスにおいて、糖負荷試験、インスリン負荷試験、運動対応能を検討する。また、高脂肪食負荷を行った際の体重と体組成の変化及び糖代謝を検討した。AMPK の活性化について Western blot 法で確認した。

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

マウス筋芽細胞である C2C12 細胞を分化させ、Ogt に対する siRNA によるノックダウン実験を行う。その際の AMPK 及び標的である ACC のリン酸化を Western blot 法で、細胞内の糖代謝を Flux Analyzer を用いて検討した。ブドウ糖取り込みについては 2-DOG uptake で行った。

加齢マウス骨格筋における Ogt の影響を検討する。

Ogt-MKO を約 1 年間飼育し、骨格筋の筋量、摂餌量、糖代謝を比較した。

マウスで得られた知見がヒトに外挿可能であるかどうか、ヒト iPS 細胞を用いて検討する。

京都大学 iPS 研究所より供与いただいたヒト iPS 細胞の MyoD を用いた分化誘導過程において、miR-494 がファイバータイプ決定の調節因子出ることを報告している 4)。本研究では iPS 細胞で Ogt ノックダウンした際の変化を immunohistochemistry, RTqPCR, Western blot, SDH 染色、細胞フラックスアナライザーで検討予定である。

骨格筋が全身の栄養状態によってどの様に制御されるかについては、ガン領域を初めとして、多くの研究がなされてきたが、細胞内の栄養状態と骨格筋に関する知見は運動時の AMPK による調節や、分枝鎖アミノ酸による骨格筋量の調節に関する検討が中心であり、GlcNAc 修飾を介した調節に関する検討はほとんどない。我々は糖尿病の研究を通じて、グルコサミン経路の役割について検討する傍ら、骨格筋におけるミトコンドリア調節に関する研究を一貫して行ってきた。これらの研究を融合させた検討は独創的である。iPS 細胞を用いた再生治療や病態解明への応用に関して種々の報告がなされているが、機能修飾を行う手法の確立が今後の課題であると

考えられる。

本研究の応用として、近年増加している肥満や糖尿病、高齢者のロコモティブ症候群やサルコペニア（筋萎縮）に対する新しい治療アプローチとなる可能性を考えている

4. 研究成果

骨格筋特異的 Ogt ノックアウトマウスの糖代謝を検討する。

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。

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。

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

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。

iPS 細胞を用いた Ogt ノックダウンの骨格筋細胞における役割

技術的な問題と研究者の異動に伴い、研究申請時に予定していた実験を期限内に実施することができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Murata K, Morino K, Ida S, Ohashi N, Lemecha M, Park SY, Ishikado A, Kume S, Choi CS, Sekine O, Ugi S, Maegawa H. Lack of O-GlcNAcylation enhances exercise-dependent glucose utilization potentially through AMP-activated protein kinase activation in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 495:2098-210, 2018
2. Ida S, Morino K, Sekine O, Ohashi N, Kume S, Chano T, Iwasaki K, Harada N, Inagaki N, Ugi S, Maegawa H. Diverse metabolic effects of O-GlcNAcylation in the pancreas but limited effects in insulin-sensitive organs in mice. *Diabetologia*, 60: 1761-69, 2017

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 骨格筋における O-GlcNAc 修飾の低下は AMPK 蛋白発現の増加を伴う抗糖尿病および抗肥満作用を有する
村田 幸一郎、森野 勝太郎、井田 昌吾、大橋 夏子、Lemecha Mengistu、Park Shi-Young、石角 篤、久米 真司、Choi Cheol Soo、関根 理、卯木 智、前川 聡 日本糖尿病学会年次学術集会 第 61 回、2018 年
2. Global and tissues-specific Ogt deletion revealed various effects of O-GlcNAcylation in glucose metabolism
S. Ida, K. Morino, N. Ohashi, O. Sekine, S. Kume, K. Iwasaki, N. Harada, N. Inagaki, S. Ugi, H. Maegawa Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (53rd), 2017
3. Lack of O-GlcNAcylation Enhances Exercise-Dependent Glucose Utilization through Amp Kinase Activation in Skeletal Muscle
Murata K, Morino K, Ida S, Ohashi N, Iwasaki H, Lemecha M, Sekine O, Kume S, Park SY, Choi CS, Ugi S, Maegawa H American Diabetes Association 77th, 2017
4. Comprehensive Analysis to Reveal Physiological Role of O-GlcNAcylation in Glucose Metabolism by Using Tissue-Specific Ogt Knockout Mice
Ida S, Morino K, Sekine O, Ohashi N, Kume S, Iwasaki K, Harada N, Inagaki N, Ugi S, Maegawa H American Diabetes Association 77th, 2017
5. 骨格筋における O-GlcNAc 修飾の低下は AMPK 活性化を介して糖利用の亢進をもたらす

- 村田 幸一郎、森野勝太郎、井田昌吾、大橋夏子、岩崎広高、Mengistu Lemecha Shukare、関根 理、久米真司、卯木 智、前川 聡日本糖尿病学会年次学術集会 第 60 回, 2017
6. 膵 細胞の O-GlcNAc 修飾はインスリン分泌と 細胞の恒常性維持に重要である
村田 幸一郎、森野勝太郎、井田昌吾、大橋夏子、岩崎広高、Mengistu Lemecha Shukare、関根 理、久米真司、卯木 智、前川 聡, 2017
 7. 膵 細胞の O-GlcNAc 修飾はインスリン分泌と 細胞の恒常性維持に重要である
井田 昌吾、森野勝太郎、大橋夏子、久米真司、関根 理、岩崎可南子、原田範雄、稲垣暢也、卯木 智、前川 聡日本糖尿病学会年次学術集会 第 60 回, 2017
 8. 膵島特異的 Ogt 欠損マウスは二相性の血糖・インスリン分泌変化をきたす
井田昌吾、関根 理、大橋夏子、久米真司、森野勝太郎、卯木 智、岩崎可南子、原田範雄、稲垣暢也、前川 聡日本糖尿病学会年次学術集会 第 59 回, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：今村武史

ローマ字氏名：Takeshi Imamura

所属研究機関名：鳥取大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：00552093

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。