

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790593

研究課題名(和文) 老化に伴うマクロファージTLRシグナル伝達阻害におけるO-GlcNAc修飾の役割

研究課題名(英文) The role of O-GlcNAc modification in aging-related deterioration of Toll-like receptor signaling in macrophages

研究代表者

白土 健 (SHIRATO, Ken)

早稲田大学・人間科学学術院・助手

研究者番号：60559384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では老化によるマクロファージ(M $\phi$ )の炎症性応答能低下の分子機序を明らかにするため、LPSに対する腹腔M $\phi$ の刺激応答性を2月齢と12月齢のマウスとの間で比較・検討した。その結果、老化初期では、1)炎症性サイトカイン産生能はタンパク質レベルで低下するが、mRNAレベルでは差がないこと、2)Toll様受容体シグナル伝達能には影響がないこと、3)mRNA翻訳を担うeIF-2 $\alpha$ のリン酸化が亢進していることがわかった。以上より、老化初期におけるM $\phi$ の炎症性応答能低下はmRNA転写後に惹き起こされ、その分子機序にはeIF-2 $\alpha$ のリン酸化亢進によるmRNA翻訳能低下が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, to clarify the molecular mechanism of age-related deterioration of macrophage inflammatory responses, lipopolysaccharide (LPS) responsiveness of peritoneal macrophages were compared between 2-month-old and 12-month-old mice. In middle age, the production of pro-inflammatory cytokine in response to LPS was reduced at the protein level but not at the mRNA level. In addition, Toll-like receptor signaling was not affected in middle age. In contrast, the phosphorylation level of eukaryotic initiation factor (eIF)-2 $\alpha$  was increased in middle age. These results suggest that macrophage inflammatory responses were deteriorated at the post-transcriptional level in middle age, and that the age-related phenomena are associated with the reduction of mRNA translation mediated by increased phosphorylation of eIF-2 $\alpha$ .

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：老化 加齢 マクロファージ リポ多糖 炎症 Toll様受容体 シグナル伝達 翻訳

1. 研究開始当初の背景

高齢者は感染症に対するリスクが高いとされており、医療費負担の増大などは大きな社会問題ともなっている。老化による生体の感染防御能の低下は、各種の免疫系細胞の機能低下と密接に関係している。特に感染防御の第一線を担うマクロファージ (MΦ) は、老化に伴って炎症性サイトカイン産生能が低下するが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。この点を明らかにすることは、高齢者の QOL や健康寿命を高める上で予防医学的な立場からも極めて重要である。

MΦの炎症性応答は、Toll 様受容体 (TLR) によるリポ多糖 (LPS) などの細菌由来因子の認識と、それに伴う細胞内シグナル伝達の活性化が不可欠である。TLR 下流のシグナル伝達にはタンパク質リン酸化カスケードが重要な役割を果たしている。このタンパク質リン酸化は主にセリン/スレオニン残基が標的となっているが、これらのアミノ酸残基には、細胞内グルコース代謝経路のうちヘキソサミン合成経路の代謝産物 *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が付加されることも確認されている (*O*-GlcNAc 修飾)。

この *O*-GlcNAc 修飾が亢進すると、リン酸の付加が阻害されることにより、TLR 下流シグナル伝達も抑制されることが報告されている。このシグナル伝達タンパク質や転写因子を標的とした *O*-GlcNAc 修飾は、細胞質に発現する *O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT) により触媒される。さらに、OGT の酵素活性は、ドナー基質となる糖ヌクレオチド UDP-GlcNAc の細胞内レベルに強く依存している。

一方、心臓、大動脈、脳、骨格筋などの各種臓器では、ヘキソサミン合成経路の律速酵素グルタミン:フルクトース6リン酸アミドトランスフェラーゼ (GFAT) の mRNA 発現量、UDP-GlcNAc の量、タンパク質の *O*-GlcNAc 修飾レベルは老化に伴って増加するとの報告もある。以上より、老化に伴う MΦの感染防御機能低下には、*O*-GlcNAc 修飾亢進による TLR シグナル伝達能低下が密接に関わっている可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、老化に伴う MΦの TLR シグナル伝達能低下の分子機構を明らかにするため、*O*-GlcNAc 修飾とその調節因子の役割について検討した。さらに、老化に伴って低下する mRNA 翻訳活性を調節する各種因子の役割についても併せて検討した。

3. 研究の方法

(1) 腹腔 MΦの採取

2月齢 (若年期) および12月齢 (中年期) の BALB/c 雄性マウスの腹腔をリン酸緩衝生理食塩水で無菌的に洗浄して MΦを採取した。それぞれ LPS 刺激群と未刺激群の二群に分け、刺激応答性を若年期と中年期との間で比較・検討した。

(2) 炎症性応答能の解析

LPS 刺激に伴って培養上清中に分泌された炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の濃度は ELISA 法で測定した。細胞内の iNOS のタンパク質発現はウェスタンブロット法で分析した。各 mRNA 発現は RT-PCR 法で分析した。TLR 下流のシグナル伝達に関わる I $\kappa$ B $\alpha$ 、p65、JNK の各発現・リン酸化レベルはウェスタンブロット法で分析した。

(3) *O*-GlcNAc 修飾調節因子の発現と機能の解析

*O*-GlcNAc の転移酵素 OGT と分解酵素 OGA、およびヘキソサミン合成経路の律速酵素 GFAT1 と GFAT2 のタンパク質と mRNA の各発現は、ウェスタンブロット法と RT-PCR 法でそれぞれ分析した。MΦの炎症性応答能に及ぼす *O*-GlcNAc 修飾調節因子の発現変化の影響を明確にするため、MΦ細胞株 RAW264.7 を用いて強制発現株を樹立、または低分子干渉 RNA を導入して検討を行った。

(4) mRNA 翻訳調節因子の発現と機能の解析

mRNA 翻訳調節を担う真核生物翻訳開始因子 (eIF) のうち 2 $\alpha$  サブユニットのリン酸化 (非活性化型) レベル、および eIF-2 $\alpha$  リン酸化酵素 PKR の発現量はウェスタンブロット法で分析した。MΦの炎症性応答能における eIF-2 $\alpha$  の役割は、RAW264.7 を eIF-2 $\alpha$  脱リン酸化酵素阻害剤 Salubrinal の存在下で LPS 刺激を行って検討した。

4. 研究成果

(1) 炎症性応答能に及ぼす老化の影響

LPS 刺激後の培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度は若年期に比べ中年期の方が明らかに低かった (図 1 A)。しかし、LPS 刺激に伴う TNF- $\alpha$  mRNA の発現増加の程度は、若年期よりもむしろ中年期の方が高かった (図 1 B)。iNOS の発現変動パターンも TNF- $\alpha$  と同様の傾向が認められた。

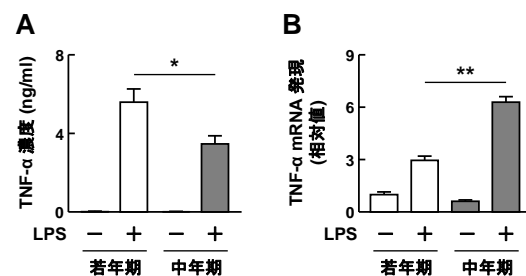


図1. LPS刺激に伴うMΦのTNF- $\alpha$ の分泌誘導(A)とmRNA産生誘導(B)に及ぼす老化の影響

Values: Means  $\pm$  SE (n=3). \*P<0.05 and \*\*P<0.01.

TNF- $\alpha$  と iNOS の遺伝子発現を調節する転写因子である NF- $\kappa$ B の p65 と JNK の p54 の各サブユニットの発現量は、両齢間で差は認められず、LPS 刺激に伴うリン酸化 (活性化) も同様に惹き起こされた (図 2)。NF- $\kappa$ B 阻害タンパク質 I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化と分解も若年期と中年期のマウスいずれも同様に惹き起こされた。以上の結果より、中年期で認め

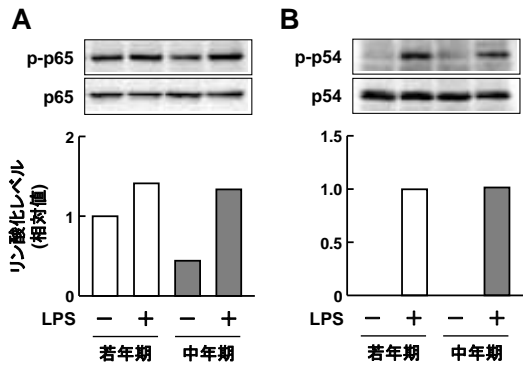


図2. LPS刺激に伴うMΦのNF-κB p65(A)とJNK p54(B)のリン酸化に及ぼす老化の影響

られる MΦ の炎症性応答能低下は mRNA 転写後レベルで惹き起こされている可能性が示唆された。一方で、老化に伴う TLR シグナル伝達能低下のモデル実験動物には、18~24 ヶ月齢の高齢期マウスが不可欠であることが明確となった。

(2) O-GlcNAc 修飾調節因子の発現量に及ぼす老化の影響

OGT および OGA の mRNA 発現は共に若年期に比べ中年期の方が高かったが、いずれもタンパク質発現では差がなかった。一方、GFAT1 の mRNA とタンパク質の発現量は両齢間で差が認められなかったが、GFAT2 ではいずれのレベルも共にその発現量は若年期に比べ中年期の方がおよそ 2.5 倍高かった (図 3)。

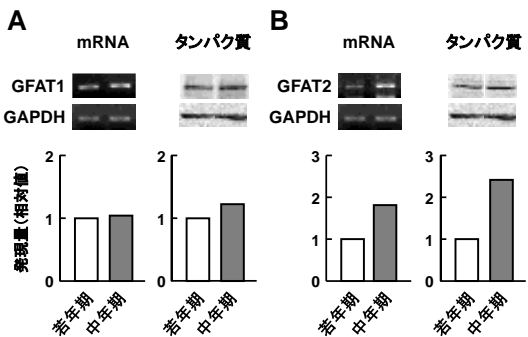


図3. GFAT1(A)およびGFAT2(B)の発現量に及ぼす老化の影響

MΦ の炎症性応答能に及ぼす GFAT2 の発現増加の影響を明確にするため、RAW264.7 に GFAT2 発現プラスミドベクターを導入して安定発現株を樹立した。さらに、限界希釈法により単一クローン株を作製した結果、いずれの株でも GFAT2 の mRNA レベルの発現増加が明らかに認められたが、タンパク質レベルでの増加は認められなかった。また、低分子干渉 RNA により GFAT2 mRNA の発現を低下させることに成功したが、タンパク質レベルでは発現が低下しなかった。以上の結果より、GFAT2 の発現増加の生理的意義の解析は今後の検討課題として残った。

(3) mRNA 翻訳調節因子の発現量に及ぼす老化の影響

eIF-2α のリン酸化レベルは若年期に比べ

中年期の方が高かった (図 4 A)。PKR のタンパク質発現も若年期に比べ中年期の方が高い傾向が認められた (図 4 B)。

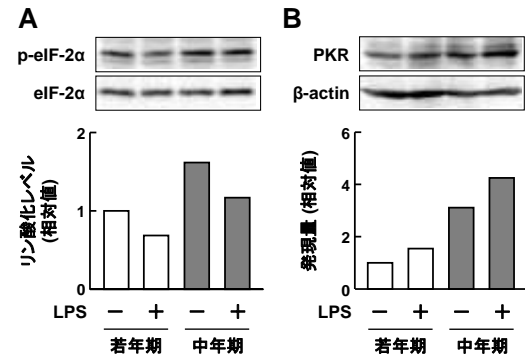


図4. eIF-2αのリン酸化レベル(A)とPKRの発現量(B)に及ぼす老化の影響

RAW264.7 の LPS 刺激に伴う TNF-α 分泌は eIF-2α 脱リン酸化酵素阻害剤 Salubrinal により有意に低下したが、その mRNA 発現誘導には影響がなかった (図 5)。以上の結果より、中年期における MΦ の炎症性応答能低下は mRNA 転写後レベルで惹き起こされ、そのメカニズムには eIF-2α のリン酸化亢進による mRNA 翻訳能低下が関与している可能性が示唆された。

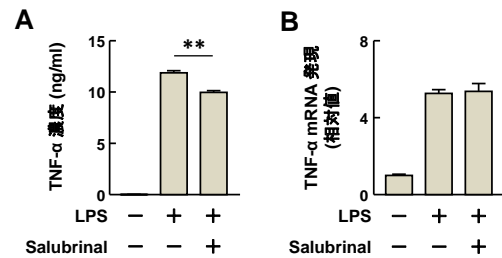


図5. LPS刺激に伴うMΦのTNF-αの分泌誘導(A)とmRNA産生誘導(B)に及ぼすSalubrinalの影響

Values: Means ± SE (n=3). \*\*P<0.01.

以上の研究成果の一部は、International Journal of Inflammation (2014: Article ID 292986, 2014) に掲載された。

## 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 8 件)

1. Shirato, K. & Imaizumi, K.: Posttranscriptional suppression of lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses by macrophages in middle-Aged mice: a possible role for eukaryotic initiation factor 2α. *Int. J. Inflamm.*, 2014: 292986, 2014.
2. Shirato, K., Gao, C., Taniguchi, N., et al. (他 6 名, 1 番目): Flagellin/Toll-like receptor 5 response was specifically attenuated by keratan

sulfate disaccharide via decreased EGFR phosphorylation in normal human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 435: 460-465, 2013.

3. Shirato, K., Sato, S., Imaizumi, K., et al. (他 3 名, 1 番目):  $\beta_2$ -Agonist clenbuterol suppresses bacterial phagocytosis of splenic macrophages expressing high levels of macrophage receptor with collagenous structure. *Biol. Pharm. Bull.*, 36: 475-480, 2013.
4. Sato, S., Shirato, K., Imaizumi, K. et al. (他 5 名, 2 番目): Intracellular  $\beta_2$ -adrenergic receptor signaling specificity in mouse skeletal muscle in response to single-dose  $\beta_2$ -agonist clenbuterol treatment and acute exercise. *J. Physiol. Sci.*, 63: 211-218, 2013.
5. Hashizume, Y., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 3 名, 2 番目): Dose-dependent effects of diallyl disulfide on plasma glucose and free fatty acid levels in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 38: 879-884, 2013.
6. Abe, I., Shirato, K., Imaizumi, K. et al. (他 6 名, 2 番目): Folate-deficiency induced cell-specific changes in the distribution of lymphocytes and granulocytes in rats. *Environ. Health Prev. Med.*, 18: 78-84, 2013.
7. Nakajima, K., Shirato, K., Taniguchi, N., et al. (他 5 名, 4 番目): Mass isotopomer analysis of metabolically labeled nucleotide sugars and N- and O-glycans for tracing nucleotide sugar metabolisms. *Mol. Cell. Proteomics.*, 12: 2468-2480, 2013.
8. Hashizume, Y., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 6 名, 2 番目): Diallyl disulfide reduced dose-dependently the number of lymphocyte subsets and monocytes in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 58: 292-296, 2012.

[学会発表] (計 13 件)

1. 白土 健, 他: リポ多糖刺激に伴うマクロファージ炎症性応答に及ぼすグルコサミンの抑制作用とメカニズム. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 札幌市, 2014 年 5 月.
2. Shirato, K., et al.: Post-transcriptional suppression of lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses by macrophages in middle-aged mice. 第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島市, 2014 年 3 月.
3. Suzuki, H., et al.: Attenuating

effects of  $\beta_2$ -agonist clenbuterol on cast-immobilization induced atrophy of skeletal muscle fibers in rats: histochemical analyses. 第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島市, 2014 年 3 月.

4. 白土 健, 他: 加齢に伴うマクロファージ炎症性応答能低下のメカニズムの解析. 第 68 回日本体力医学会大会, 東京, 2013 年 9 月.
5. 鈴木英樹, 他: ギプス固定によるラット骨格筋の萎縮に対するクレンプテロールの抑制作用. 第 68 回日本体力医学会大会, 東京, 2013 年 9 月.
6. Shirato, K., et al.: Suppressive effects of glucosamine on macrophage inflammatory responses are mediated by endoplasmic reticulum stress. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜市, 2013 年 9 月.
7. Gao, C., et al.: Flagllin/Toll-like receptor 5 response was specifically attenuated by keratan sulfate disaccharide via decreased EGFR phosphorylation in normal human bronchial epithelial cells. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜市, 2013 年 9 月.
8. Nakajima, K., et al.: Mass isotopomer analysis of metabolically labeled nucleotide sugars and N- and O-glycans for tracing nucleotide sugar metabolisms. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜市, 2013 年 9 月.
9. 白土 健, 他: マウス腹腔常在性マクロファージのグルタミン-フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素の発現量は加齢により増加する. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 名古屋市, 2013 年 5 月.
10. 阿部郁美, 他: ラットのリンパ球サブセット数および顆粒球数に及ぼす葉酸欠乏の影響. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 名古屋市, 2013 年 5 月.
11. 小林 歩, 他: 亜鉛欠乏時のラット骨格筋内亜鉛の動態. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 名古屋市, 2013 年 5 月.
12. 橋爪陽子, 他: ラットリンパ球サブセット数および単球数に及ぼす Diallyl disulfide の影響. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 名古屋市, 2013 年 5 月.
13. 三橋亮介, 他: ラット骨格筋および褐色脂肪組織の熱散逸能に及ぼす関節固定の影響. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 名古屋市, 2013 年 5 月.

[図書] (計 4 件)

1. Shirato, K. & Imaizumi, K.: Mechanisms underlying the suppression of inflammatory responses in peritoneal macrophages of middle-aged mice (in press). In: Sport Science Series on

- “Active Life” . Kanosue, K. (Series Ed.), Vol. II. : Physical Activity, Exercise, Sedentary Behavior and Health Promotion. Oka, K., Cao, Z.B., & Oshima, S. (Eds.), Springer-Japan, Tokyo, 2014.
2. Shirato, K., Sato, S., Imaizumi, K., et al. (他 3 名, 1 番目): Effects of  $\beta_2$ -agonist administration on bacterial phagocytosis by splenic macrophages in mice (in press). In: Sport Science Series on “Active Life” . Kanosue, K. (Series Ed.), Vol. II. : Physical Activity, Exercise, Sedentary Behavior and Health Promotion. Oka, K., Cao, Z.B., & Oshima, S. (Eds.), Springer-Japan, Tokyo, 2014.
  3. Sato, S., Shirato, K., Imaizumi, K. et al. (他 3 名, 2 番目): Functional roles of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in skeletal muscle hypertrophy and atrophy (in press). In: Sport Science Series on “Active Life” . Kanosue, K. (Series Ed.), Vol. II. : Physical Activity, Exercise, Sedentary Behavior and Health Promotion. Oka, K., Cao, Z.B., & Oshima, S. (Eds.), Springer-Japan, Tokyo, 2014.
  4. 白土 健, 今泉和彦: アルコール摂取は褐色脂肪組織活性を亢進させるか (pp.148-149). In: ここまでわかった燃える褐色脂肪の不思議 (齊藤昌之, 大野秀樹編), NAP, 東京, 2013.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白土 健 (SHIRATO, Ken)

早稲田大学・人間科学学術院・助手

研究者番号 : 6 0 5 5 9 3 8 4

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

該当無し