

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700859

研究課題名(和文) 糖尿病の改善効果を評価するための新規指標物質の開発

研究課題名(英文) Altered expression of glycoproteins and glycosphingolipids in a mouse model whose glycemic status is controlled by a low carbohydrate ketogenic diet

研究代表者

奥田 徹哉 (OKUDA, Tetsuya)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：20443179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：食事コントロールによる糖尿病の予防・改善効果を評価するための新規指標物質の開発を目指し、糖尿病発症に関わるO-GlcNAc化タンパク質を中心に指標候補物質を探索した。有望な候補として、インスリンシグナル伝達に關与するAktタンパク質を見出し、高血糖下のマウス肝臓ではAktがO-GlcNAc化されることで、その活性化に必要なリン酸化修飾が妨害されることを示す知見も得た。更に、糖タンパク質や糖脂質に見られるシアリル化糖鎖を指標候補として見出し、その発現量が低炭水化物食(ケトン食)の摂取やレプチンにより影響を受けることを明らかにした。またケトン食に、過食による脂肪肝の形成を抑制する効果を見出した。

研究成果の概要(英文)：Abnormal modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is known to be associated with the pathology induced by hyperglycemia. However, the dynamic mechanism of O-GlcNAc modification under hyperglycemic conditions in vivo has not been fully characterized. Here we showed that Akt protein kinase was modified by O-GlcNAc in the liver of mice under hyperglycemic condition, and the modification levels were decreased by improvement of hyperglycemia. Furthermore, aberrant phosphorylation of Akt was found in the liver of mice under hyperglycemic condition. In addition, we found that feeding of a very low carbohydrate diet (ketogenic diet) influenced the expression levels of sialoglycans in mouse liver. To develop a quantification method for these sialoglycans, we generated monoclonal antibodies react with these sialoglycans.

研究分野：糖鎖生物学、糖鎖抗原、糖鎖発現制御

キーワード：糖鎖抗原 糖尿病 食事療法 ケトン食 バイオマーカー O-GlcNAc スフィンゴ糖脂質 ob/obマウス

1. 研究開始当初の背景

日本では食生活習慣の大きな変化により糖尿病を代表とする生活習慣病の発症率が高まっている。生活習慣病の予防および治療の基本となるのは食生活の改善であり、食事による血糖値のコントロールは薬物療法以上に重要であるとされている。日常的な過食による慢性的な高血糖は、様々な代謝性疾患の発症リスクを増加させる。一方で、慢性的な高血糖、これにより発症する慢性的な組織病変、これらを直接結びつける分子機構は未だ明確でない。これが問題点として立ちどころ、食事による血糖値のコントロールに基づく生活習慣病の予防・改善効果の指標開発を困難なものとしている。

研究代表者らは、細胞内タンパク質の *N*-アセチルグルコサミン付加 (*O*-GlcNAc 化) が、上記指標物質として有用であると予想し検討を進めていた。*O*-GlcNAc 化とは、シグナル分子、転写因子、プロテアソーム関連分子、ストレス応答因子などのタンパク質に見られる分子修飾であり、グルコースの代謝産物から細胞質酵素により合成される。その機能的な意義は十分に解明されていなかったが、近年になり、タンパク質のセリン/スレオニン残基をリン酸化と競合して修飾することで、基質タンパク質の機能を制御することがわかってきた。

研究代表者らは、この *O*-GlcNAc 化が糖尿病発症の分子メカニズムに深く関与することに着目した。特に、人為的に *O*-GlcNAc 化タンパク質を増大させたモデル動物がインスリン抵抗性の 2 型糖尿病を発症することや、*O*-GlcNAc 化が過剰に起こる細胞モデルではシグナル伝達分子が不活化されインスリン抵抗性が惹起されることから、高血糖及び食事によるその改善が *O*-GlcNAc 化タンパク質のレベルに影響するならば、目的とする糖尿病 (合併症) の進行度やその改善効果を反映する指標となると考えた。

2. 研究の目的

糖尿病発症に関わる *N*-アセチルグルコサミン付加 (*O*-GlcNAc 化) ならびにその蓄積と、高血糖が惹起する耐糖能低下や代謝異常などの慢性的な組織病変とが、どのように相関するのかを明らかにする。研究代表者らは、低炭水化物 / 高脂肪食であるケトン食を摂

取させることで高血糖モデルマウスの血糖値を持続的に改善した食餌摂取モデルと、*O*-GlcNAc 化タンパク質を解析するための様々な手法を確立しており、これらの材料・技術と、得られる知見をもとに、食事による糖尿病の予防・改善効果を高精度に評価できる新規指標物質の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) モデルマウスの飼育方法

O-GlcNAc 化タンパク質の解析では、過食により高血糖の表現型を呈するモデルマウス (*ob/ob*) を用いた。通常食には CE-2、低炭水化物食 (ケトン食) には F3666 を用い、7 週間の食餌摂取後に組織試料を採取した。食餌摂取期間中は血糖値を測定し、通常食摂取群では高血糖、ケトン食摂取群では高血糖の改善が持続していることを確認した。

(2) モデルマウスの表現型解析

血液生化学的検査、組織病理検査、体重測定、食餌摂取量測定、脂質分析等を実施し、モデルマウスの基本的な表現型を確認した。

(3) *O*-GlcNAc 化タンパク質の解析

糖尿病に関連する主要な臓器 / 組織として、肝臓、腎臓、膵臓、筋肉、脂肪組織を選択し、確立した食餌摂取モデルのエンドポイントにて採取した組織試料をウエスタンブロットにて解析した。各組織試料は、緩衝液中で破碎し遠心分離することで、*O*-GlcNAc 化タンパク質の濃縮画分とし、解析に用いた。各組織における *O*-GlcNAc 化タンパク質の総量は ELISA 法により解析した。特定の *O*-GlcNAc 化タンパク質については、免疫沈降法、プロテオミクス解析、ウエスタンブロットを組み合わせることで解析した。

(4) シアリル化糖鎖の解析

肝臓より抽出した糖タンパク質や糖脂質由来のシアリル化糖鎖は、抗体検出、TLC、HPLC により解析した。

(5) 抗体の作製

マウスに目的糖鎖をコンジュゲートした抗原複合体を免疫し、血清中への目的抗体の産生を確認できたマウスよりリンパ球を採集し、常法によりハイブリドーマを作製した。

目的糖鎖に反応するモノクローナル抗体産生株は、免疫原、目的糖鎖を含有する血清糖タンパク質、糖脂質を抗原とする ELISA にて選別した。

4. 研究成果

(1)ケトン食の持続的な摂取は、*ob/ob* マウスの各種病態を改善する。

過食により肥満化し、糖尿病様病態を発症するモデルマウス (*ob/ob*) を用いて、ケトン食を持続的 (7週間) に摂取させた際の効果を解析した。すでにケトン食の持続的摂取後の *ob/ob* マウスでは、このマウスの表現型である高血糖、高インスリン血漿、脂肪肝が改善することを見出していたが、有意差検定に十分な匹数を評価できていなかったため、本研究期間ではまず再現性について検討した。その結果、上述の効果の再現性を十分に確認できたため、以前の成果とともにとりまとめ、論文として成果を発信した (Okuda et al. 2012)。

(2)高血糖下のマウス肝臓では、*O*-GlcNAc 化された Akt タンパク質が増加する。

N-アセチルグルコサミン付加 (*O*-GlcNAc 化) は、細胞内タンパク質に見られる分子修飾であり、その修飾量は細胞外グルコース濃度に影響を受ける。生体内では高血糖が起因となり、シグナル伝達タンパク質等において異常な *O*-GlcNAc 化が起こることが示唆されており、糖尿病患者に見られる組織病態の分子基盤として注目されている。我々の確立した食餌摂取モデルでは、*ob/ob* マウスの高血糖の表現型が野生型マウスと同等レベルまで改善した状態が持続し、特に肝臓における *O*-GlcNAc 化タンパク質の発現量が強く影響を受けることがわかっていた。このような *O*-GlcNAc 化タンパク質は、高血糖により惹起される組織病態の進行度を判別できる指標候補と考えられ、その活用に向けて候補となるタンパク質の同定を試みた。プロテオミクス解析や免疫沈降法とウエスタンブロットを組み合わせた検討により、プロテインキナーゼである Akt タンパク質を同定することに成功した。

続けて、本モデルマウス肝臓における Akt タンパク質の *O*-GlcNAc 化について、免疫沈降法及びウエスタンブロットにより詳細な

解析を実施したところ、*O*-GlcNAc 化 Akt は高血糖の表現型を呈する通常食摂取群のみで検出され (図 1、chow) ケトン食摂取により血糖値が正常レベルまで改善したマウス群からはほとんど検出されなかった (図 2、KD)。一方で、Akt タンパク質は両群間にて同等に発現していたことから、Akt タンパク質の *O*-GlcNAc 化レベルが高血糖及びその改善により影響を受けることが示された。



図 1 : ウエスタンブロットによる Akt タンパク質の *O*-GlcNAc 化レベルの解析

通常食摂取群 (chow) 及びケトン食摂取群 (KD) の *ob/ob* マウス肝臓由来試料をプール (n=5) し、抗 Akt 抗体にて免疫沈降した後抗 *O*-GlcNAc 抗体 (上段) または抗 Akt 抗体 (下段) を用いたウエスタンブロットングにより解析した。高血糖の表現型を呈する chow のみで *O*-GlcNAc 化が明確に検出される。

(3)Akt の *O*-GlcNAc 化は、Akt の活性化に必要な Thr308 のリン酸化と負に相関する。

細胞内インスリンシグナル伝達系において、Akt は主要なシグナルメディエーターであり、上流因子によりリン酸化されることで活性化し、下流にシグナルを伝える。この活性化には、Akt タンパク質の 308 番目のスレオニン残基 (Thr308) と、473 番目のセリン残基 (Ser473) の 2 箇所のリン酸化が必要である。一方で、Akt が *O*-GlcNAc 化されると、Thr308 のリン酸化が妨害されることが細胞レベルでの研究にて見出されており、インスリン抵抗性の発症に寄与すると考えられていた。上述のように、我々のモデルでは *O*-GlcNAc 化 Akt が検出されるため、Akt のリン酸化状態についてもウエスタンブロット

により解析した。まず、Akt の Ser473 のリン酸化状態を調べたところ、高インスリン血漿である通常食摂取群の *ob/ob* マウス由来サンプルからは、高インスリン血漿が改善しているケトン食摂取群よりも有意なリン酸化の増強が確認された (図 2、A 及び C) この結果から、高インスリン血漿のマウス肝臓では、細胞内のインスリンシグナル伝達系が恒常的に活性化していることがわかる。しかし、Thr308 のリン酸化は全く増強していなかった (図 2、A 及び B)。図 1 の結果と共に考察すると、Akt の O-GlcNAc 化は Thr308 のリン酸化と負に相関しており、Akt の Thr308 のリン酸化は O-GlcNAc 化により妨害されるという、細胞実験にて見出された現象が、生体内においても起こりうることを示された。以上の成果は、論文としてとりまとめ、成果発信した (Okuda et al, 2013)。

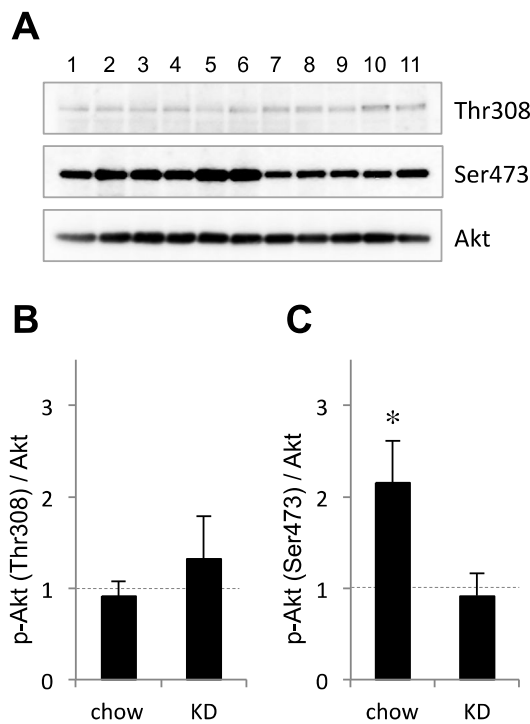


図 2 : ウェスタンブロットによる Akt のリン酸化レベルの解析

(A) *ob/ob* マウス肝臓由来試料を用い、Akt の活性化に必要なリン酸化である Thr308 部位 (上段) 及び Ser473 部位 (中段) のリン酸化レベルを解析した。レーン 2-6 : 通常食摂取 *ob/ob* マウス群、レーン 7-11 : ケトン食摂取 *ob/ob* マウス群。対照として、野生型マウス由来の肝臓ライセートをレーン 1 に示

した。(B、C) 検出されたバンドの強度をイメージアナライザーで数値化し、p-Akt/Akt の値を野生型マウスの強度の比としてグラフ化した。(Error bars: mean \pm S.D., n = 5. * $P < 0.05$ chow-fed *ob/ob* mice vs. KD-fed *ob/ob* mice)

(4) ケトン食の摂取は肝臓に発現するシアリル化糖鎖の発現量に影響を及ぼす。

上述のように、Akt の O-GlcNAc 化は、機能的にもインスリン抵抗性と密にリンクしており、肝臓における糖尿病関連病態の診断に有効と考えられる。一方で、診断指標としての利便性を考えた際、血液中に検出される糖タンパク質糖鎖の変化として検出できれば、診断指標として実用性が高い。見出した O-GlcNAc 化 Akt は、細胞内糖タンパク質であるため、分泌型の糖タンパク質の糖鎖構造、特にシアリル化糖鎖を解析した。その結果、ケトン食摂取により強く影響を受けるシアリル化糖鎖を見出したが、その構造はスフィンゴ糖脂質の糖鎖構造であることを偶然見出した。現在までに、この変化はケトン食摂取やレプチンにより影響を受けることを見出しており、この糖鎖変化の定量的解析に向けて必要なモノクローナル抗体の開発を進めている。開発に成功した目的糖鎖エピトープに反応するモノクローナル抗体やその製法については、成果をとりまとめ 2 件の特許を出願中である (PCT/JP2014/02401、PCT/JP2014/02402)。

(5) ケトン食は過食により誘発される脂質合成を伴う脂肪肝形成を抑制する。

我々は、過食により肥満化し高血糖や肝腫大を伴う脂肪肝を発症する *ob/ob* マウスに、低炭水化物食かつ高脂肪食であるケトン食を持続的に摂取させると、肥満は進行するが脂肪肝が著しく改善することを見出している。一方で、他グループによる過去の研究では、野生型マウスにケトン食を持続的に摂取させると脂肪肝の形成が進行すると報告がなされている。このケトン食の相反する効果について、野生型マウス (c57BL/6) と *ob/ob* マウスを同条件にて飼育し、比較検討したところ、これまでの報告通り、野生型では脂肪肝形成が進行し、*ob/ob* マウスでは逆に改善

していることを確認した。詳細な解析により、高脂肪食であるケトン食は健常なマウスに摂取させた場合、ある程度の脂肪肝形成を誘発するが、*ob/ob* マウスに見られるような過食によって誘発される脂質生合成を伴う脂肪肝形成については抑制的作用を発揮することを明らかにした。本成果は、学会発表により成果発信し、論文発表に向けて準備を進めている。

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2件)

Tetsuya Okuda, Asami Fukui, Naoki Morita. Altered expression of *O*-GlcNAc-modified proteins in a mouse model whose glycemic status is controlled by a low carbohydrate ketogenic diet. *Glycoconjugate Journal*, 査読有, 30, 2013, 781-789, DOI: 10.1007/s10719-013-9482-x

Tetsuya Okuda, Naoki Morita. A very low carbohydrate ketogenic diet prevents the progression of hepatic steatosis caused by hyperglycemia in a juvenile obese mouse model. *Nutrition & Diabetes*, 査読有, 2, 2012, e50, DOI: 10.1038/nutd.2012.24

[学会発表](計11件)

奥田徹哉、スフィンゴ糖脂質類似体を用いた糖鎖認識抗体の開発、古川鋼一教授退任記念シンポジウム、2015年1月9日、名古屋大学医学部(愛知県・名古屋市)
奥田徹哉、福井麻美、森田直樹、グルコースの欠乏モデルマウスに見られる複合糖質の発現変化、第87回日本生化学会大会、2014年10月16日、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)

奥田徹哉、福井麻美、森田直樹グルコースの欠乏が生体内の糖鎖発現に及ぼす影

響、第33回日本糖質学会年会、2014年8月12日、名古屋大学豊田講堂(愛知県・名古屋市)

奥田徹哉、福井麻美、長島生、榎本賢、森田直樹、清水弘樹、Generation of antibodies reactive with sialylated glycans、第13回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会、2014年2月18日、産業技術総合研究所つくばセンター(茨城県・つくば市)

奥田徹哉、福井麻美、森田直樹、ケトダイエットによる脂肪肝の改善と関連する実験結果、第19回日本肝臓医生物学研究会、2013年11月30日、北海道大学医学部(北海道・札幌市)

Tetsuya Okuda, Exploring novel carbohydrate biomarkers: Altered expression of *O*-GlcNAc-modified proteins in a hyperglycemic mouse model, BPT-AIST Joint symposium on Life Science and Technology Innovation, 2013年11月14日、ボゴール(インドネシア)

奥田徹哉、福井麻美、長島生、榎本賢、森田直樹、清水弘樹、糖鎖抗原を検出するためのモノクローナル抗体の開発、産総研オープンラボ2013、2013年10月31日-11月1日、産業技術総合研究所つくばセンター(茨城県・つくば市)

奥田徹哉、福井麻美、長島生、榎本賢、森田直樹、清水弘樹、新規糖鎖含有化合物を用いた抗糖鎖モノクローナル抗体の開発、第86回日本生化学会大会、2013年9月12日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

奥田徹哉、福井麻美、長島生、榎本賢、森田直樹、清水弘樹、シアリル化糖鎖を検出するための新規モノクローナル抗体の開発、第32回日本糖質学会年会、2013年8月7日大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

奥田徹哉、森田直樹、食餌による高血糖の改善が細胞内タンパク質の*N*-アセチルグルコサミン付加に及ぼす影響、第85回日本生化学会大会、2012年12月15日、マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

奥田徹哉、森田直樹、糖質制限食の摂取が糖尿病の病態に及ぼす効果とその分

子機構の解析、第 31 回日本糖質学会年
会、2012 年 9 月 18 日、鹿児島市民文化
ホール(鹿児島県・鹿児島市)

〔図書〕(計 1 件)

奥田徹哉、近江谷克裕、エヌ・ティー・エス、
新機能抗体開発ハンドブック、抗体の標識/
修飾：酵素標識、2012、205-208

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：糖鎖抗原の免疫誘導剤
発明者：奥田徹哉、清水弘樹
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2014/02401(WIPO)
出願年月日：2014 年 5 月 2 日
国内外の別：外国

名称：シアリル化糖鎖を認識するモノクロー
ナル抗体
発明者：奥田徹哉
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2014/02402(WIPO)
出願年月日：2014 年 5 月 2 日
国内外の別：外国

〔その他〕

ホームページ等
糖鎖の簡易解析手法の開発及び病態特異的
な糖鎖発現制御機構の解析
[http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/re
search.html](http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/research.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 徹哉 (OKUDA, Tetsuya)
国立研究開発法人産業技術総合研究所
・生物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：20443179