

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08630

研究課題名(和文)糖代謝に影響を及ぼすニトロ化分子の特異的検出法開発

研究課題名(英文)Detection of nitrated molecules involved in sugar metabolism

研究代表者

江口 裕伸 (Eguchi, Hironobu)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60351798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニトロ化IL-18の糖尿病との関連を明らかにし、疾患マーカーとしての有用性を評価するものである。本研究において、IL-18のニトロ化は糖代謝機能などを減弱させることを明らかにした。さらに、ニトロ化IL-18は糖尿病モデルマウスでも認められた。また、ニトロ化を受ける分子としてNAD⁺を同定した。ニトロ化によりNAD⁺の機能が低下することが認められた。さらにNOによるDNAメチル化により糖転移酵素の発現が低下し、糖鎖構造に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the function of nitrated IL-18 in diabetes, and evaluate as a disease marker. It was found that nitration of IL-18 attenuated sugar metabolism such as STAT3 phosphorylation in gluconeogenesis. Furthermore, nitrated IL-18 was found in the diabetes model mice. These results suggested that nitrated IL-18 maybe involved in the development of diabetes mellitus. Also, NAD⁺ was identified as a target molecule of NO. It was found that a function of NAD⁺ decreased by nitration. It was also found that NO reduced the expression of glycosyltransferase, FUT8, by the induction of DNA methylation. Because NAD⁺ and oligosaccharide structures are molecules taking the important role in sugar metabolism, these modifications maybe involved in the development of diabetes.

研究分野：糖代謝

キーワード：糖尿病

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病対策では前糖尿病状態での早期診断が、その後の予防や治療などに影響することから重要である。現在、診断法として早朝空腹時血糖と糖化ヘモグロビンが指標となっていが、これらの指標はどちらも空腹時血糖に影響されやすい。そのため、食事の影響を受けにくいマーカーの確立が求められている。

(2) 糖尿病では NO が患者血清中で増加していることから、病態に深く関与していると考えられる。また、サイトカインも増加しており、糖尿病性腎症との関与が示唆されている。

(3) 糖尿病では糖代謝異常が生じ、糖代謝の中心的役割を担うのが NAD⁺である。NAD⁺の変化は酵素反応に影響するため、病態に関与していると考えられる。

(4) 糖タンパク質糖鎖は糖代謝に影響する。しかし、活性酸素と糖鎖との関連性はほとんどわかっていない。

(5) 研究代表者は糖尿病で増加する NO がサイトカインである IL-18 をニトロ化することを見出しており、ニトロ化による IL-18 の機能変化について解析してきた。その過程で、複数のニトロ化される化合物も見出してきた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、糖尿病のインスリン抵抗性を引き起こすと考えられる NO と IL-18 との関連を解明し、サイトカインを主眼においたマーカーの確立である。また、ニトロ化の影響を受ける分子として糖転移酵素であるフコース転移酵素および NAD⁺にも着目し、以下の項目を解明することを目的とした。

NO は、種々のタンパク質などを酸化修飾し、機能変化を引き起こす。本研究では、NO による IL-18 の機能変化と病態との関連について解析した。

ニトロ IL-18 の抗体作成を検討した。

糖尿病のモデル動物において、ニトロ化修飾された IL-18 の量の変化を解析した。

ニトロ化による NAD⁺の構造変化を解析し、その補酵素としての機能変化も検討した。

NO のフコース転移酵素の機能の影響を解析するため、フコース転移酵素 8 (FUT8) を中心に解析した。

3. 研究の方法

(1) NO による IL-18 の機能変化の解析

マウスより分離した肝プライマリー細胞を用いて、ニトロ化 IL-18 による糖代謝シグナルの変化をウエスタンブロット法にて解析した。

IL-18 は IFN の発現を誘導する。KG-1 培養細胞を用いて、ニトロ化による IL-18 誘導性 IFN の産生能の変化を解析した。

IL-18 は受容体を介してシグナルを伝達する。ニトロ化による KG-1 細胞への IL-18 の結合能の変化をフローサイトメトリー解析した。

終末糖化産物受容体 (RAGE) の発現は糖尿病での機能障害に関与する因子として注目されている。ニトロ化 IL-18 による RAGE の発現変化を解析した。

(2) ニトロ化 IL-18 特異抗体の作製

IL-18 のニトロ化部位のペプチドを合成し、NO によりニトロ化ペプチドを作成した。KLH 化したのちウサギに免疫してニトロ化 IL-18 抗体を作製し、検討した。

(3) 糖尿病モデルマウスでのニトロ化 IL-18 の解析

糖尿病モデルマウスの腎臓より IL-18 を生成し、ニトロ化の程度を解析した。

(4) NO による NAD⁺の構造変化の解析

NAD⁺, NADH をペルオキシ亜硝酸で処理し、構造変化を HPLC にて解析した。

構造変化したフラクションを回収し、質量分析を行った。

NO 処理した NAD⁺を用いて、乳酸脱水素酵素活性の変化を解析した。

(5) NO による FUT8 の発現の変化の解析

NO 処理した IM-9 または HepG2 培養細胞を用いて FUT8 の mRNA、発現タンパク量、酵素活性変化を解析した。

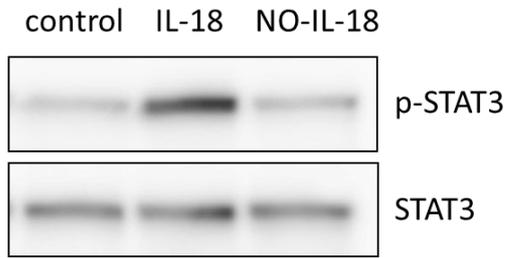
NO による FUT8 の CpG アイランドの DNA メチル化解析を行った。

4. 研究成果

(1) NO による IL-18 の機能変化の解析

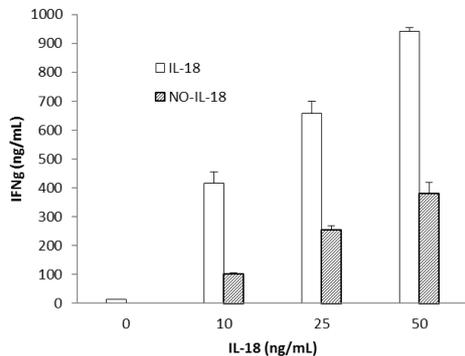
IL-18 は糖代謝に関与しており、STAT3 のリン酸化を引き起こす。ノックアウトマウスの解析では IL-18 が存在しないため STAT3 のリン酸化が起こらず、シグナルが伝達されなくなり、糖尿病になると考えられる。肝細胞を IL-18 で処理すると、STAT3 がリン酸化される。STAT3 は糖新生に関与し、糖代謝で重要な役割を担う。ニトロ化 IL-18 はこのリン酸化能が低下しており、糖代謝異常を引き起こすことが認められた。(図 1)

図 1



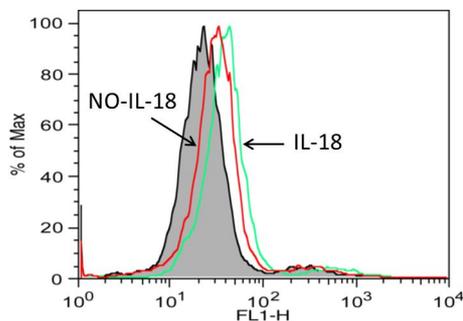
さらに、IL-18 は炎症時に IFN の発現を誘導し、感染防御機構として重要な役割を担っている。この作用におけるニトロ化の影響を培養細胞で検討したところ、ニトロ化により IFN 活性は半分以下にまで低下することが認められた。(図 2)

図 2



このように、ニトロ化により IL-18 の作用が著しく低下していることから、受容体との結合が阻害されていることが考えられたため、受容体との結合能を FACS にて解析した。その結果、ニトロ化により受容体との結合が明らかに低下していた(図 3)。IL-18 のニトロ化部位近傍には受容体との結合に必要なドメインが存在しており、ニトロ基はこのドメインの結合に影響していると考えられた。

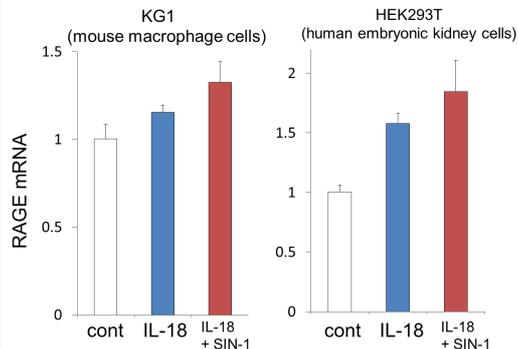
図 3



炎症性サイトカインは慢性的に産生されると腎障害を引き起こし、糖尿病性腎症を発症すると考えられている。IL-18 も IFN の発現誘導により、腎症の発症に関与すると考えられるが、本研究において IFN はニトロ化により低下することが分かった。そこで、ニトロ化 IL-18 の腎症への関与を検討するため、腎培養細胞を用いて RAGE の発現解析を行った。RAGE は糖尿病で増加することが報告されており、病態の悪化に関与すると考えられている。

ニトロ化 IL-18 は HEK293 および KG1 培養細胞において、RAGE の発現を促進させた。この RAGE 産生促進は mRNA の発現増加を伴っていることが認められた(図 4)。この結果は、ニトロ化 IL-18 は IFN ではなく RAGE を介して腎障害に関与していることを示唆した。

図 4



(2) ニトロ化 IL-18 に対する特異抗体の作製

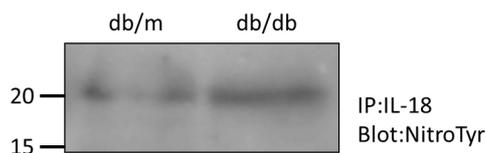
IL-18 の 49 番目と 118 番目のチロシンがニトロ化部位であるため、それぞれの部位を含む 2 種類のニトロ化 IL-18 ペプチドを化学合成した。これらのペプチドを NO によりニトロ化し、KLH 化してウサギに免疫した。いくつかの抗体が得られたが、反応性が弱く、ELISA に使用可能な抗体は得られなかった。これは、ニトロ化される配列の抗原性が弱く、修飾されていない IL-18 に対する抗体が誘導されやすいためと考えられる。ペプチド配列はいくつか検討したが良い結果を得られなかったため、動物種の変更など、さらに検討を重ねる必要がある。

(3) 糖尿病モデルマウスでのニトロ化 IL-18 の解析

db/db マウスは肥満を伴う自然発症型の糖尿病モデルマウスである。このマウスは NO の産生が増加していることが知られている。ニトロ化した IL-18 の検出を解析するため、抗 IL-18 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗ニトロチロシン抗体でプロットし、糖尿病マウスでのニトロ化 IL-18 を解析した。その結果、

糖尿病マウスではコントロールに比べニトロ化されている IL-18 が多く検出された。この結果は実際の生体内でも IL-18 はニトロ化修飾を受けていることを示唆するものである。

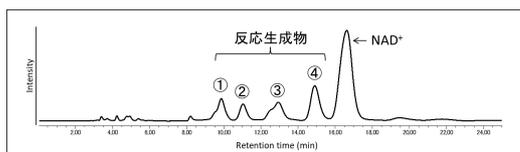
図 5



(4) NO による NAD⁺の構造変化の解析

NAD⁺は代謝に重要な役割を担う補酵素であり、糖代謝においても解糖系、TCA 回路、電子伝達系で関与している。飲酒などでは NADH/NAD⁺ の変化により代謝経路が変化し、低血糖などの病態を引き起こす。糖尿病でも同様に病態に関与していることから、本研究では NO との関わりについて検討した。HPLC 解析の結果、NAD⁺は図 5 に示すようなピークに分離された。これらの反応生成物が混在している状態で酵素反応を毛移籍したところ、活性が 30%程度低下していた。反応生成物が全体の 3~4 割程度を占めていることから、ニトロ化された NAD⁺は酵素反応には関与していないものと考えられた。

図 5



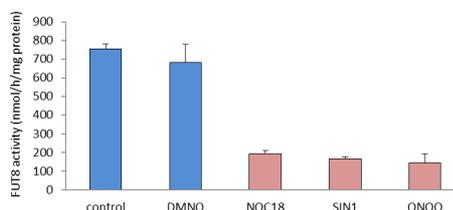
さらに反応生成物を質量分析にて解析した結果、ニトロ化されていることが認められた。この結果は糖尿病などで産生される NO は、NAD⁺をニトロ化することにより糖代謝を減弱し、病態に関与していることが示唆された。

(5) NO による FUT8 の発現の変化の解析

糖尿病では糖タンパク質糖鎖はタンパク質自身の機能に深く関与しており、糖鎖構造変化は病態に関与することが知られている。糖尿病においても糖鎖が関与していることが報告されているが、糖鎖構造の変化を引き起こす原因は明らかでない。本研究では NO が糖鎖構造に影響するか解析するため、FUT8 に着目して解析した。

培養細胞を NO 処理すると、FUT8 の mRNA、タンパク質、活性がすべて低下していた(図 6)。この結果は NO が転写レベルで FUT8 の発現に関与していることを示唆している。

図 6



NO による FUT8 の転写レベルでの制御を検討するため、DNA のメチル化を解析した。FUT8 には CpG アイランドが存在することから、NO によりメチル化され、発現制御を受けている可能性が考えられた。メチル化特異的プライマーを構築し、解析した結果、NO は FUT8 のメチル化を強く促進することが認められた。この結果は NO により転写レベルで糖転移酵素の発現が制御されていることを示しており、糖鎖構造変化に起因する病態に関与していることが考えられた。

(6) まとめ

本課題において、IL-18 は 49 番目と 118 番目のチロシンが亜硝酸イオンによりニトロ化修飾を受けることが明らかとなった。ニトロ化を受けることによって糖新生経路に関与する STAT3 のシグナルの阻害が認められた。IL-18 ノックアウトマウスでも同様に STAT3 のシグナル経路の阻害が報告されており、ニトロ化は IL-18 の機能に大きく影響することが分かった。IL-18 ノックアウトマウスでも糖尿病症状が認められていることから、ニトロ化による IL-18 機能不全も糖尿病に関与している可能性が非常に大きいと考えられた。さらに、ニトロ化は感染防御に有効な IFN の誘導活性を低下させた。これは、糖尿病の病態悪化に関与するだけでなく、感染性の増加につながる原因になると考えられた。さらに、腎臓においては糖尿病の発症に深いかわりを持つ RAGE の発現を誘導したことから、腎症の原因になる可能性も示唆された。

ニトロ化 IL-18 に対する抗体は特異性が低く、野生型の IL-18 にも反応してしまった。ペプチドの配列の検討を行ったが、ニトロ基の抗体産生能が低く、ELISA に使用可能な抗体を得られなかった。そのため、免疫沈降反応を利用した検出系を構築し、糖尿病モデルマウスを用いて検討した。その結果、糖尿病マウスの腎臓でニトロ化 IL-18 と考えられるタンパク質が検出され、NO に長期的に暴露されている病態では生体内でもニトロ化 IL-18 が産生されていることを示唆するものであり、大きな発見であると考えられる。

糖尿病でのマーカーは多くの候補があるが、食事の影響を受けにくいものを見つけることは困難な状況である。糖尿病ではサイトカインも多く産生されるが、これらは非特異的なものであり、診断に用いることは難しい。

しかし、IL-18 は炎症以外では著名な増加をしないことから、食事の影響を受けにくい疾患マーカーとなることが期待される。今回の検討結果では、ニトロ化により IL-18 の機能が変化し、糖尿病の病態とのかかわりを明らかにすることができた。今後抗体作成などの検討を重ねて、疾患マーカーとしての検出系の確立を行いたい。

NO により、NAD⁺ はニトロ化修飾を受け、複数の生成物ができることが確認された。これらはこれまで報告されている構造とは異なっていると考えられ、新規の化合物であると考えられる。そのうち質量分析にて解析ができたものもあり、今後 NMR でも構造決定が必要である。

ニトロ化された NAD⁺ を用いた酵素反応では、反応低下を認めた。これはニトロ化修飾された NAD⁺ は酵素反応に寄与しないことを示唆している。NO による NAD⁺ 機能阻害はこれまでの糖尿病での病態を新しい視点でとらえることのできる可能性を持っており、さらに検討を重ねることによって疾患マーカーや治療薬へとつながる可能性が考えられた。

糖代謝には糖タンパク質糖鎖の働きが重要である。これまでに糖尿病で糖鎖構造が変化することは報告されているが、糖鎖構造に対する活性酸素の影響はまだ不明な点が多い。本研究では NO により FUT8 の発現が低下していることを見出した。さらにその機序として NO による DNA メチル化の亢進が関与していることを明らかにできた。今後 NO による糖鎖合成不全がどのように病態に関与しているのかを明らかにしていきたい。

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)

[学会発表](計 5 件)

江口裕伸、崎山晴彦、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎、ペルオキシ亜硝酸は IL-18 をニトロ化し、STAT3 のリン酸化を阻害する、第 90 回日本生化学会大会、2017.12.8、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

江口裕伸、崎山晴彦、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎、IL-18 のニトロ化は受容体への結合能を低下させる、活性酸素種が IL-18 の発現に与える影響、第 17 回日本 NO 学会学術集会、2017.5.19~20、阿波観光ホテル(徳島県・徳島市)

Hironobu Eguchi, Haruhiko Sakiyama, Daisaku Yoshihara, Noriko Fujiwara, Keiichiro Suzuki, Study of the IL-18 nitration by peroxynitrite and RAGE expression in diabetes mellitus, The 9th International Conference on the Biology,

Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2016.5.20-22, Sendai International Center (Sendai, Japan)

江口裕伸、崎山晴彦、吉原大作、藤原範子、是金敦子、大河原知水、鈴木敬一郎、ペルオキシ亜硝酸イオンによる IL-18 のニトロ化と機能変化、第 88 回日本生化学会大会、2015.12.3、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

江口裕伸、崎山晴彦、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎、IL-18 のニトロ化部位の解析とニトロ化による機能変化、第 15 回日本 NO 学会学術集会、2015.5.26~27、千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 裕伸 (EGUCHI, HIRONOBU)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：60351798

(2) 研究分担者

鈴木 敬一郎 (SUZUKI, KEIICHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：70221322

藤原 範子 (FUJIWARA, NORIKO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：10368532

崎山 晴彦 (SAKIYAMA, HARUHIKO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：30508958

吉原 大作 (YOSHIHARA, DAISAKU)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：00567266