

令和元年5月23日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16094

研究課題名(和文) 組織特異的ノックアウトマウスを用いた糖鎖修飾酵素OGTの尿細管における機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of glycosylation enzyme OGT in the renal tubule using tissue specific knockout mouse

研究代表者

南 悠季子 (Minami, Yukiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30793880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖修飾の1つであるO-GlcNAc修飾を担う酵素OGT (O-GlcNAc transferase) がMRと強く結合し、MRの糖鎖修飾を介してその機能の調節をしていることを見出し、かつ、主なMR発現臓器である腎臓において、OGTが尿細管に広範囲に発現していることを確認した。標的遺伝子の評価を行い、腎尿細管におけるOGTは、MR活性上昇を介した高血圧病態への関与という機能を持つ一方で、腎組織メンテナンスにおいて重要な保護的役割を担っていることを示し、本研究を通じて、腎尿細管OGTの多面的機能が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの報告で、全身OGT ノックアウトマウスモデルは胎生致死であり、また誘導型心筋特異的OGT ノックアウトマウスを用いた検討では、OGTは心筋に対し保護的な機能を有することが明らかになってきたが、他臓器におけるOGTの機能については未解明な点が多かった。本研究結果から、OGTの腎尿細管特異的な機能について新たな知見が得られたことは、学術的に重要な意義を持つ。OGTを介して行われる糖鎖修飾は、糖尿病など生活習慣病の病態形成にも深く関与する。本研究結果を通じて得られた腎尿細管OGT機能に関する知見は、糖尿病や腎不全の新たな治療戦略への糸口になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：O-GlcNAc transferase (OGT) is ubiquitously expressed but the study for tissue specific role of OGT has been limited. In this study, renal tubule-specific OGT knockout (KO) mice were established and analyzed. In vitro assay demonstrated that OGT interacts with mineralocorticoid receptor (MR) as a coactivator and this KO model exhibited severe dehydration and decreased expression of MR-target gene such as epithelial sodium channel (ENaC), which is consistent with the result of in vitro study. In addition, this KO model exhibited impaired function and abnormal morphology in the kidney, suggesting that renal tubule OGT also has protective role on kidney development.

研究分野：内分泌学

キーワード：ミネラルコルチコイド受容体(MR) O-GlcNAcトランスフェラーゼ(OGT) 糖鎖修飾

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

1. 研究開始当初の背景

O-GlcNAc (O-linked- N-acetylglucosamine) 修飾は、ヘキサミン合成経路の下流に位置する糖鎖修飾の1つで、高血糖を含め、生活習慣病の病態と深く関与することが知られている。O-GlcNAc 修飾の程度は、基質となる糖あるいはグルコサミン量の影響を受ける他、フルクトース 6 リン酸からグルコサミン 6 リン酸への変換を担う酵素 GFAT (glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase) の活性など、ヘキサミン生成過程における様々な段階の調節を受けるが、中でも O-GlcNAc 基の蛋白への転移を担う OGT (O-GlcNAc transferase) がこの糖鎖修飾の律速酵素になっていることが知られている。O-GlcNAc 修飾によって機能調節を受ける蛋白は、LXR (liver X receptor) (J Biol Chem. 2010)、FXR (farnesoid X receptor) (Hepatology. 2014) などの核内受容体型転写因子やヒストン蛋白 (Nature. 2011) など多岐にわたり、DNA 脱メチル化に関わるエピジェネティクス制御因子である TET2 (ten eleven translocation 2) との関連も報告されている (Nature. 2013)。このことから、OGT は生体機能維持において極めて重要な役割を果たしていることが予想される。しかしながら、全身 OGT ノックアウトマウスモデルは胎生致死であり、臓器特異的な OGT の機能については、報告が少なく依然未解明な部分が多い。誘導型心筋特異的 OGT ノックアウトマウスを用いた検討では、冠動脈結紮術後の心不全が重症化することが示されており (Proc Natl Acad Sci USA. 2010) 心筋に対し OGT は保護的な作用を持つと考えられている。

一方、近年ミネラルコルチコイド受容体 (MR) 拮抗薬の心血管保護および生命予後改善効果が多くの大規模臨床試験で報告されているという背景から (RALES 試験: N Eng J Med. 1999、EPHESUS 試験: N Eng J Med. 2003 など) 当教室では、MR 活性化の分子機構に着目した研究を続けてきた (J Biol Chem. 2007、J Biol Chem. 2010)。その一環で新規 MR 相互作用因子として OGT を同定し、OGT が MR の O-GlcNAc 修飾を介して MR の転写活性を増強し、MR の coactivator として機能することを新たに見出した (論文投稿準備中)。MR の主たる発現部位は、腎遠位尿細管であり、Na 再吸収を介した血圧維持作用が知られている。そこで、マウス組織標本を用いて腎臓における OGT の発現を確認したところ、広く尿細管に発現し、また興味深いことに近位尿細管と遠位尿細管でその発現様式が異なり、近位尿細管では核内に加えて刷子縁でも高発現を認めることを確認した。このことは、MR と同在を共にする遠位尿細管では上記の in vitro の解析結果を裏付ける OGT の機能が確認されることを予想させるとともに、MR が発現していない近位尿細管において、OGT は MR 活性調節とは異なる重要な機能を有することを示唆していると考えられたが、これまで遺伝子改変マウスを用いて OGT の腎尿細管における機能を明らかにした報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、腎尿細管特異的 Cre 発現モデルである Ksp1-Cre マウスと OGT-flox マウスを交配させ、腎尿細管特異的 OGT ノックアウトマウス (以下 KspOGT-KO と略す) を作出し、その表現型解析を通じて、腎尿細管における OGT の機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) KspOGT-KO の作出および遺伝子改変の確認

OGT 遺伝子は X 染色体上に位置し、Ksp1-Cre transgene の発現が陽性であれば、雄はすべてノックアウトとなるため、雄を用いて解析を行う。Ksp1-Cre マウスと OGT-flox マウスの交配により得られた KspOGT-KO を用い、20 週齢で臓器摘出を行い、腎臓における flox allele の recombination をゲノム PCR により確認する。また、MR に関連する臓器として、腎臓の他に腸管、心臓、大動脈も摘出し、他の臓器では遺伝子改変が起こっていないことを確認する。

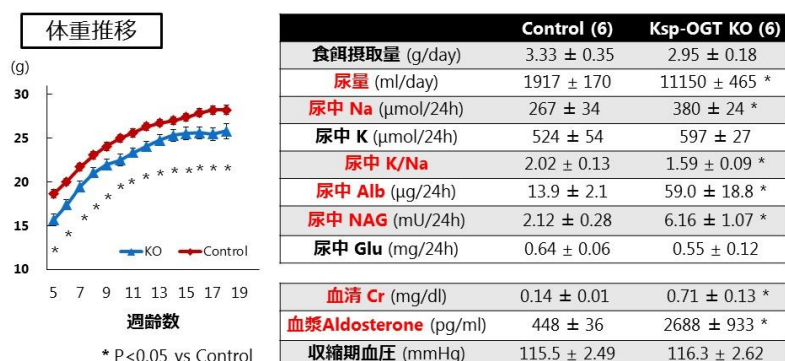
(2) KspOGT-KO の表現型解析

まず一般身体所見として、体重、血圧、尿量などの経時変化を観察する。観察終了時には、採血を行い、ホルモン値や一般性化学検査項目の測定を行う。また、腎病理所見を観察するとともに、摘出した臓器から、mRNA および蛋白を抽出し、腎における MR 標的因子として知られる ENaCa や Sgk1 の発現を確認する。またそれ以外の遺伝子発現についても評価し、OGT の標的になっているか否かを確認する。

4. 研究成果

まず、腎組織においてのみ、OGT-flox allele の recombination が生じていることを確認し、腎組織における OGT の発現は 40% 低下していた (p=0.012)。離乳後

図1 体重および生化学所見



若週齢より Control 群と KspOGT-KO 群の間に体重の差を認め(図1)、その後も体重差が維持されることが確認された。血圧に関しては、有意な差を認めなかった。さらに、KspOGT-KO 群では、Control 群と比較して、5 倍以上の尿量を認め、明らかに多尿を呈して

いた。摂餌量には、両群間で有意な差は認めず、体重差は多尿による体液量の減少が影響している可能性が示唆された。また、KspOGT-KO 群では、著明な高アルドステロン血症を呈しており、体液量減少および MR 機能低下に伴う代償性の変化と考えられた。尿中 K/Na 比は、KspOGT-KO 群で低値傾向を示し、MR 活性の低下が示唆された。摘出腎より mRNA を抽出し、MR 標的遺伝子である ENaC α および Sgk1 発現を評価したところ、ENaC α 発現の有意な低下を認め(図2)、血中アルドステロン値が上昇しているにもかかわらず、MR 活性が低下していることが示された。このことから、これまでの当教室において in vitro の検討で明らかにした「OGT は MR の coactivator として作用する」という所見と合致する結果が得られたと考えている。

さらに血中 Cr 値の有意な上昇を認め、尿細管における OGT は腎の発生過程およびその後の腎機能に強い影響を持つことも示唆された。KspOGT-KO 群では、尿中アルブミンの増加も認めた。摘出腎の肉眼所見および組織所見では、KspOGT-KO 群において、著明な嚢胞性変化が観察された(図3)。上記で示したように、KspOGT-KO 群で MR 活性が低下しているのであれば、それは腎保護的に働くことが予想され、KspOGT-KO における Cr の上昇や腎嚢胞形成は別の機序が考えられたため、さらなる標的遺伝子の評価を行った。その結果、KspOGT-KO 群では著明な Collagen 分子の低下が見られ、嚢胞形成への関与が示唆された。また PAI-1 の著明な上昇も認め、血栓症などから腎障害をもたらしている可能性も示唆された(図4)。このように、腎尿細管における OGT は、MR 活性上昇を介した高血圧病態への関与という機能を持つ一方で、腎組織メンテナンスにおいて重要な保護的役割を担っていることも示唆され、本研究を通じて、腎尿細管 OGT の多面的機能が明らかになった。

図2 KSP-OGT KOの腎組織におけるMR活性



図3 腎の肉眼的・組織学的所見

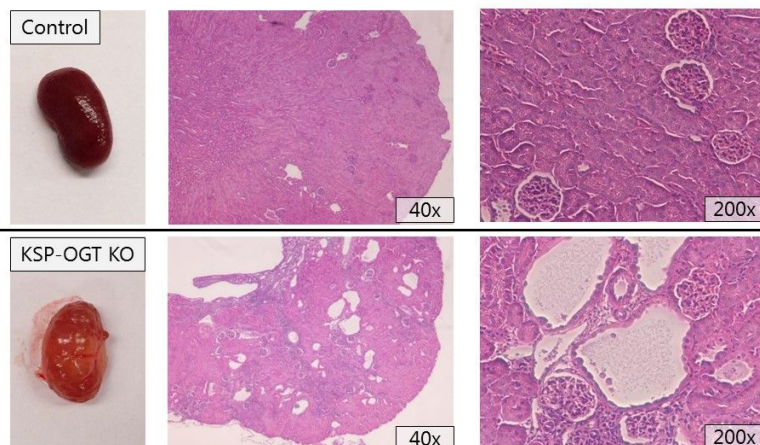
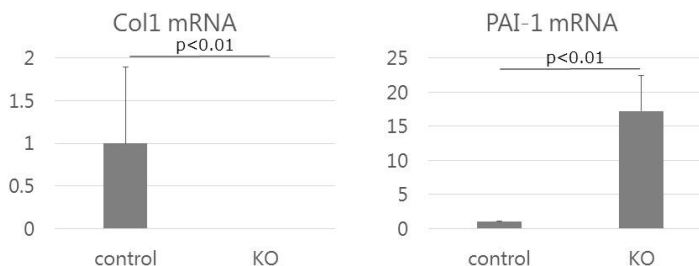


図4 KSP-OGT KOの腎組織における発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 南 悠季子, 中村 俊文, 三石 木綿子, 横田 健一, 小林 佐紀子, 武田 彩乃, 中島 秀明, 栗原 勲, 伊藤 裕. 腎尿細管特異的 OGT 欠損マウスの表現型解析を通して見る腎尿細管 OGT 機能の多面性. 第 36 回 内分泌代謝学サマーセミナー. 2018 年

2. 中村 俊文, 小池 悠季子, 栗原 勲, 小林 佐紀子, 横田 健一, 中島 秀明, 伊藤 裕. 臓器特異的遺伝子改変モデルを用いた腎尿細管における OGT 機能の解析. 第 35 回 内分泌代謝学サマーセミナー. 2017 年
3. 中村 俊文, 栗原 勲, 小林 佐紀子, 横田 健一, 盛崎 瑞葉, 高畑 尚, 大嶋 洋佑, 小池 悠季子, 伊藤 裕. 遺伝子改変マウスを用いた血圧調節における腸管上皮 MR 機能の解析. 第 90 回 日本内分泌学会学術総会. 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

6. 研究組織
該当なし