

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08998

研究課題名(和文)腸上皮組織におけるO-GlcNAc修飾の役割の解明

研究課題名(英文)Role of O-GlcNAcylation in the Intestinal epithelial cells

研究代表者

卯木 智(Ugi, Satoshi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：20378483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸管上皮におけるO-GlcNAc修飾が栄養素の吸収や糖代謝に与える影響を明らかにするため、腸管上皮細胞特異的Ogt遺伝子欠損マウスを作製し、表現型を検討した。また腸内分泌細胞(STC-1細胞)で、糖輸送担体の発現を検討した。Ogt-VKOは低体重、血糖低下をきたし、経口ブドウ糖負荷試験にて血糖上昇が抑制された。機序として小腸でSGLT1発現が低下していることを見いだした。さらに、STC-1細胞において、O-GlcNAc修飾の増減させることで、SGLT1発現量がKOマウスの結果と同様に变化した。O-GlcNAc修飾は腸管において糖質の吸収に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管を介した糖吸収が、全身の代謝に関わるという点で画期的である。O-GlcNAc修飾は腸管内の糖質を感知することで、PKA-CREBを介してSGLT1の発現を調整しており、O-GlcNAc修飾を介したグルコース吸収の抑制は肥満、糖尿病の新しい治療法につながる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the effects of O-GlcNAcylation in the intestinal epithelium on nutrient absorption and glucose metabolism, we generated intestinal epithelial cell-specific Ogt gene-deficient mice and examined their phenotype. Ogt-VKO mice showed low body weight, hypoglycemia, and suppressed glucose elevation in an oral glucose tolerance test. We found that SGLT1 expression was downregulated in the small intestine. Furthermore, in an enteroendocrine cell-line STC-1 cells, increasing or decreasing O-GlcNAcylation resulted in a similar change in SGLT1 expression as in the KO mice, suggesting that O-GlcNAcylation is involved in carbohydrate absorption in the intestinal tract.

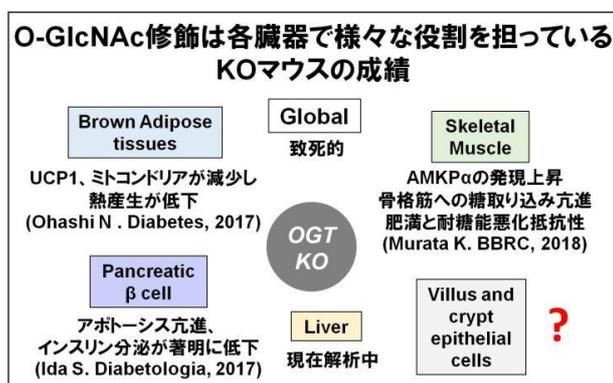
研究分野：糖尿病

キーワード：糖鎖修飾 腸管 SGLT1

1. 研究開始当初の背景

O-GlcNAc 修飾は、細胞内に流入したブドウ糖の一部がヘキソサミン生合成経路に流入し産生される UDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) を基質とし、転移酵素 O-GlcNAc transferase (OGT) によって蛋白のセリン/スレオニン残基に付加される修飾である。この経路には、ブドウ糖のほかにアミノ酸や脂肪酸代謝産物が流入することから、細胞内の栄養センサーとしての役割を担っていると考えられている(右図)。この経路が糖尿病をはじめとする代謝異常に関連していることが知られている。例えば、高血糖によって活性化された O-GlcNAc 修飾が、肝臓における糖毒性によるインスリン抵抗性の主要な一因であることが示されている。

我々は、ショウジョウバエにおいて O-GlcNAc 修飾酵素遺伝子をノックダウンすると、インスリン産生量、インスリン感受性とも変化することを報告している (Sekine O. JBC 2010)。さらに、我々は、O-GlcNAc 修飾が、様々な臓器において、臓器特異的な役割を担っていると考えている(図次頁上)。脾細胞特異的 Ogt 欠損マウスは、細胞がアポトーシスをおこし、インスリン分泌が著明に低下すること、褐色脂肪特異的 Ogt 欠損マウスは、UCP-1 発現、PGC-1 の発現の低下とミトコンドリア関連蛋白の発現の低下のため、寒冷環境下で体温が顕著に低下し、致死性であること、骨格筋特異的 Ogt 欠損マウスでは、AMKP の発現が上昇し、骨格筋への糖の取り込み亢進、運動による著明な血糖低下、高脂肪食による肥満と耐糖能悪化を抑制することを報告している。



2. 研究の目的

腸管は、消化、吸収以外に内分泌器官としての作用を有しており、栄養素の代謝を行う重要な器官である。翻訳後修飾である O-GlcNAc 修飾は、細胞内のブドウ糖の一部がヘキソサミン生合成経路に流入し産生される UDP-GlcNAc が、O-GlcNAc transferase (OGT) により標的分子に付加される翻訳後修飾である。ブドウ糖などの代謝産物も基質となることから、O-GlcNAc 修飾は細胞内栄養センサーと考えられている。しかし、腸管での O-GlcNAc 修飾が、腸管からの栄養素の吸収、特にグルコース代謝をどのように調節するかについては、ほとんど知られていない。そこで我々は、小腸での O-GlcNAc 修飾の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 絶食が腸管での O-GlcNAc 修飾に及ぼす影響 (C57BL/6J マウスでの検討): 細胞内栄養センサーと考えられている O-GlcNAc 修飾の腸管での生理的な役割を解明するため、絶食にした正常マウスの腸内の O-GlcNAc 修飾の変化を調べた。

(2) 腸管の O-GlcNAc 修飾欠損が糖代謝に及ぼす影響 (Ogt-VKO、Ogt-iVKO マウスでの検討): 2 系統の小腸特異的 OGT 欠損マウス (先天性: Ogt-VKO マウス、タモキシフェン誘導性: Ogt-iVKO マウス) を作製し、体重の変化、糖・脂質代謝、エネルギー代謝、インクレチン分泌の変化を観察した。

(3) O-GlcNAc 修飾による SglT1 遺伝子発現調節機構の検討 (STC1 細胞、Ogt-VKO マウスでの検討): 腸管内分泌細胞である STC-1 細胞及び Ogt-VKO の腸管上皮細胞を用いて、O-GlcNAc 化による SglT1 遺伝子発現の変化とその調整機構の確認を行った。

(4) 腸管以外での O-GlcNAc 修飾が SGLT1 に及ぼす影響 (Ogt-KO マウスでの検討): 全身性の OGT 欠損マウス (Ogt-KO) を作成し、SGLT1 が発現している腎臓での SglT1 の発現の確認を行った。

4. 研究成果

(1) 絶食における腸管での O-GlcNAc 修飾の変化の検討:

24 時間絶食で正常マウスの腸管上皮では Ogt 蛋白の変化はみられなかったが、O-GlcNAc 修飾の低下を確認した。

(2) 腸管における O-GlcNAc 修飾が糖代謝に及ぼす影響:

Ogt-VK を作成し対照マウスと比較したところ、離乳時から低体重と随時血糖値の低値を認めた。栄養吸収を確認するために経口および腹腔内ブドウ糖負荷試験を行った。結果、経口ブドウ糖負荷試験でのみ血糖の上昇は有意に抑制された。また Ogt-VKO の小腸で SGLT1 の遺伝子とタンパクの発現が低下していることを、RT-qPCR 法、ウェスタン法、蛍光免疫組織法で確認した。さらに授乳期の影響を除外するために Ogt-iVKO を作成し検討した。タモキシフェン投与後に体重と随時血糖値は低下したが摂餌量は対照マウスと同等であった。また SGLT1 を介した糖吸収を評価するため D-キシロースを経口投与し、Ogt-iVKO でキシロースの吸収抑制が認められた。更に経口ブドウ糖試験では GLP-1 の追加分泌が抑制された。

(3) O-GlcNAc 修飾による Sglt1 遺伝子発現調節機構の検討:

STC-1 細胞を用いて、O-GlcNAc 修飾の変化が Sglt1 の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。O-GlcNAc 修飾の基質であるグルコサミン投与で O-GlcNAc 修飾、Sglt1 の遺伝子発現は増加したが、OGT 阻害薬で減少した。続いて O-GlcNAc 修飾が SGLT1 の発現を調整する機序を検討した。既報から cAMP が SGLT1 の発現に関与している報告があり、下流にある PKA 阻害剤又は CREB による転写因子活性阻害剤をそれぞれ投与したところ O-GlcNAc 修飾による Sglt1 の遺伝子発現の上昇が抑制された。また小腸の SGLT1 の発現が減少している Ogt-VKO で CREB のリン酸化が抑制されており、STC1 細胞に対するグルコサミン投与で CREB のリン酸化の増加が確認された。

(4) 腸管組織以外での O-GlcNAc 修飾が SGLT1 に及ぼす影響:

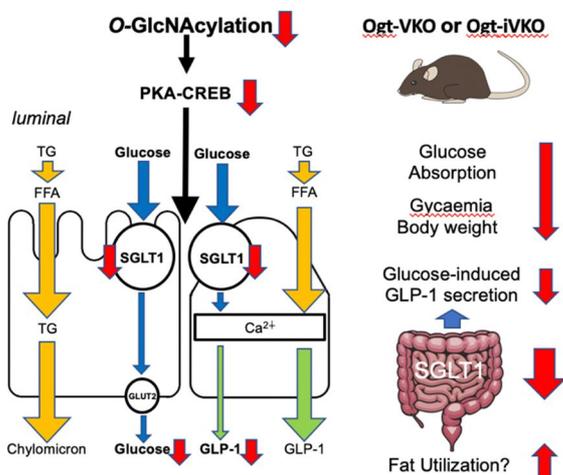
Ogt-KO にて腎臓でも Sglt1 の発現が低下していることが確認された。

(5) 考察

絶食では腸管へのグルコース流入量の減少により基質が不足したため、O-GlcNAc 修飾が減少したと推測した。そこで O-GlcNAc 修飾を欠損させる事で腸管内での空腹時の代謝状態を模倣出来る可能性を考え、腸管特異的 OgtKO マウスを作製した。すると Ogt-VKO、Ogt-iVKO 共に体重減少及び血糖低下を示した。経口ブドウ糖負荷試験で血糖値の上昇は抑制されていたことから、腸管からのグルコース吸収が抑制されている可能性が考えられた。

腸管での糖輸送担体の発現を調べたところ、SGLT1 の発現が低下している事が確認され、D-キシロースの吸収や GLP-1 の追加分泌の抑制からも SGLT1 の発現が低下している事が実証された。次に STC-1 細胞にて O-GlcNAc 修飾が Sglt1 遺伝子発現を調整することを確認し、さらに詳細な機序として cAMP を介した Sglt1 の安定性もしくは PKA-CREB を介したものが考えられた。加えて、腎臓での結果から O-GlcNAc 修飾は、組織特異的ではない方法で Sglt1 遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

O-GlcNAc 修飾は腸管内の糖質を感知することで、PKA-CREB を介して SGLT1 の発現を調整しており、O-GlcNAc 修飾を介したグルコース吸収の抑制は肥満、糖尿病の新しい治療法につながる可能性があると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura Kimihiro, Fujita Yukihiro, Ida Shogo, Yanagimachi Tsuyoshi, Ohashi Natsuko, Nishi Kiyoto, Nishida Atsushi, Iwasaki Yasumasa, Morino Katsutarō, Ugi Satoshi, Nishi Eiichiro, Andoh Akira, Maegawa Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Glycaemia and body weight are regulated by sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1) expression via O-GlcNAcylation in the intestine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101458 ~ 101458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2022.101458	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西村公宏、藤田征弘、井田昌吾、柳町剛司、西田淳史、安藤 朗、森野勝太郎、卯木 智、前川 聡
2. 発表標題 腸管上皮細胞のO-GlcNAc修飾は栄養吸収の調整に重要である
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村 公宏、藤田 征弘、井田 昌吾、柳町 剛司、森野 勝太郎、卯木 智、前川 聡、安藤 朗、西田 淳史
2. 発表標題 腸管での -GlcNAc修飾は吸収を介して糖代謝の恒常性に寄与している
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村 公宏、井田 昌吾、森野 勝太郎、大橋 夏子、藤田 征弘、今井 隆行、西田 淳史、杉谷 義彦、安藤 朗、卯木 智、前川 聡
2. 発表標題 腸管上皮細胞のO-GlcNAc修飾は栄養吸収に重要である
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会 2019.5.23-25
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村公宏、藤田征弘、井田昌吾、柳町剛司、西田淳史、安藤 朗、森野勝太郎、卯木 智、前川 聡
2. 発表標題 腸管でのO-GlcNAc修飾はブドウ糖吸収を制御し、糖代謝の恒常性に寄与している
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村公宏、藤田征弘、井田昌吾、柳町剛司、西田淳史、安藤 朗、森野勝太郎、卯木 智、前川 聡
2. 発表標題 腸管でのO-GlcNAc修飾はブドウ糖吸収を制御し、糖代謝の恒常性に寄与している
3. 学会等名 第64回 日本糖尿病学会年次学術集会 年次学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------