

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700780

研究課題名（和文） 生体内の糖化修飾タンパク質を利用した、食事による糖尿病予防効果の評価法の確立

研究課題名（英文） Altered expression of *O*-GlcNAc-modified proteins 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

研究成果の概要（和文）：本研究では、糖尿病の主病態である高血糖による臓器への直接的な悪影響を考慮した新規な栄養指標開発について、新たなモデルマウスの確立に基づき検討した。特に、高血糖と相関して細胞内にて増大することが知られるタンパク質の「*O*-GlcNAc 化」に着目し、食事による高血糖の改善がその生体内動態にどのように影響するのかを明らかにした。また、確立したモデルマウスを用いて、高血糖を起因とする組織病態（脂肪肝）の発症機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have established a mouse model which is useful in evaluating the *in vivo* dynamics of protein *O*-GlcNAc modification. By using this model, we revealed that global *O*-GlcNAc levels in tissue proteins were strictly maintained at a constant level, in spite of their glycemic status, whereas the expression levels of certain *O*-GlcNAc-modified proteins responded to the glycemic status. This study also revealed the effectiveness of a low carbohydrate ketogenic diet for improving hyperglycemia and thereby preventing the development of steatosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：*O*-GlcNAc、糖尿病、高血糖、脂肪肝、脂肪酸、*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。その予備群の数は約3000万人に及ぶと推定されており、緊急の対策が社

会的に必要とされている。糖尿病の主な発症リスクファクターとして、日常的な過食による高血糖が指摘されており、よって食生活の改善により発症リスクの低下や病状の緩解が期待されている。このような背景から、食物摂取エネルギー量(cal)、血糖上昇度を示す

GI (グリセミックインデックス)、GL (グリセミックロード) 値などの栄養指標の概念が広く浸透しつつあり、国民の健康への意識も高まっている。しかし、単に cal/GI/GL が低値な食品を摂取すれば発症が予防できるというわけではなく、正確には高血糖により惹起される組織/細胞レベルでの慢性的な病変の改善を評価する必要がある。そのためには、高血糖を起因とする細胞内の慢性病変を評価できる有効な指標の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、高血糖により影響を受けることが知られる細胞内タンパク質の「O-GlcNAc 化」に着目し、これを指標として用いることで、食品が有する糖尿病予防効果を評価する方法の確立を目指している。本研究期間では、食餌により高血糖の表現型を改善したモデルマウスの確立と、生体試料中の O-GlcNAc 化タンパク質の定量的分析法の確立を目標とした。よって確立したモデルと分析法により、食餌による高血糖の改善が、O-GlcNAc 化タンパク質の生体内動態にどのように影響するのかについて検討した。

3. 研究の方法

(1) 食餌により高血糖を改善したモデルマウスの確立

過食により高血糖の表現型を示すモデルマウス (*ob/ob* マウス) を、通常食および糖質制限食 (Ketogenic diet: KD) にて飼育することで、その血糖値を持続的に高低にコントロールした食餌摂取モデルを確立した。

(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、食餌摂取量測定等により、確立したモデルマウスの表現型を解析した。中性脂肪 (トリグリセリド、コレステロール) の含量は、市販の生化学分析キットにより測定した。脂肪酸の分子種は、ガスクロマトグラフィーにより分析した。組織抽出液中のタンパク質の発現は、SDS-PAGE により解析した。そのうち、同定が必要なタンパク質については、SDS-PAGE によるタンパク質の分離後、CBB 染色によりタンパク質を染色し、目的とするタンパク質に由来するバンドを切り出し、酵素消化した後、LC-MS/MS によりペプチド断片の質量を測定し、得られた結果よりタンパク質の実体を予測した。予測されたタンパク質の検出抗体を用いたウエスタンブロット法により、目的のタンパク質を最終的に同定した。

(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、確立した食事摂取モデルのエンドポイントにて組織試料を採取した。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を調製した。調製した試料中の O-GlcNAc 化タンパク質の総量は ELISA 法により解析した。更に、SDS-PAGE により分子量の異なる O-GlcNAc 化タンパク質を分離し、それぞれの発現量をウエスタンブロット法にて解析した。O-GlcNAc 化タンパク質検出には、抗 O-GlcNAc 抗体 (CTD110.6) を用いた。

4. 研究成果

(1) 食餌により高血糖を改善したモデルマウスの確立

本研究では、肥満及び糖尿病のモデルマウスとして汎用されている *ob/ob* マウスを、目的とするモデル確立に利用した。このマウスは、食欲抑制ホルモンであるレプチンを欠損したマウスで、過食の表現型を示し、その結果として慢性的な高血糖が見られる。高血糖の表現型は、特に若年期 (離乳後~14 週齢) に増強することが知られている。そこでまず、この表現型を確認するために、生後 5 週齢~12 週齢の *ob/ob* マウスを通常食 (CE-2) 摂取下にて飼育し、血糖値のレベルを測定したところ、CE-2 の摂取下にて持続的な高血糖が惹起されていることを確認した。次に、理論的な糖質制限食である KD にて、同週齢のマウスを飼育したところ、KD 摂取期間における持続的な血糖値の改善が確認された。実験期間中における *ob/ob* マウスの血糖値の平均値は、通常食摂取群の *ob/ob* マウスで 194.6 mg/dl、KD 摂取群の *ob/ob* マウスで 103.6 mg/dl であった。なお、通常食摂取群の野生型マウスの同条件下での血糖値の平均値が 142.4 mg/dl であった。

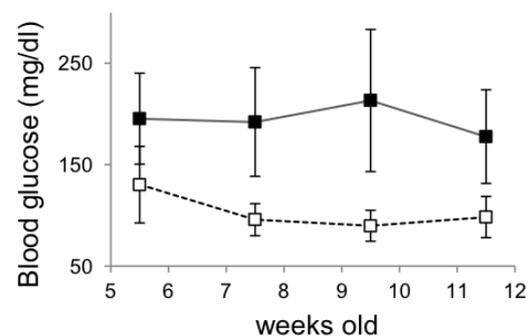


図 1 : モデルマウスの血糖値

通常食又は糖質制限食 (KD) により飼育した *ob/ob* マウスの血糖値を示す。横軸にマウス

の週齢、縦軸に血糖値 (mg/dl) を示す。
 ■ : 通常食摂取群、□ : KD 摂取群、means ± S. D., n = 9

飼育期間中、各 *ob/ob* マウス群は明らかな異常なく生育し、*ob/ob* マウスの主要な表現型である肥満は、通常食摂取群と KD 摂取群間において同等に進行した。また、カロリーベースの食餌摂取量も 2 群間で同等量 (約 18 kcal/day) であった。KD 摂取群では、血液中にグルコースに代わる栄養素となるケトン体が上昇しており、かつ血糖値も一定のレベルで維持されていることから、これらにより末梢組織まで十分な栄養が供給されていると考えられる。以上の結果から、上述の条件下にて飼育した *ob/ob* マウスを、目的とするモデルマウスとして確立した。

(2) モデルマウスの表現型解析

確立したモデルマウスのエンドポイントにて、マウスの主要な臓器/組織試料を採取したところ、2 群間における著明な肝臓の形態の差異が見られた。病理解析及び中性脂肪の含量の解析の結果、通常食摂取群では *ob/ob* マウスの表現型である脂肪肝が形成されているが、KD 摂取群ではこの表現型が改善されていることが判明した (図 2)。

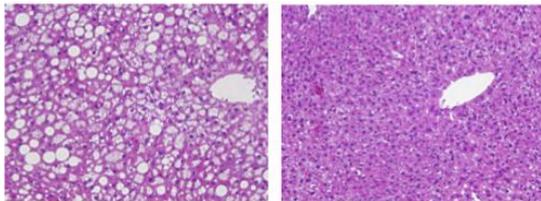


図 2 : マウス肝臓の病理像

左図 : 通常食摂取群の *ob/ob* マウス肝臓

右図 : KD 摂取群の *ob/ob* マウス肝臓

通常食摂取群では、多数の脂肪滴が肝臓全体に観察される。一方で、KD 摂取群では、脂肪滴はほとんど観察されない。

この KD による脂肪肝改善効果のメカニズムについて検討したところ、肝臓に発現するタンパク質のうち、KD 摂取群にて発現量が著しく低下するタンパク質を見いだした。このタンパク質を同定したところ、脂肪酸合成酵素 (FAS, ACC1) であった。肝臓の総脂質を用いた脂肪酸分析では、上述の脂肪酸合成酵素により合成される脂肪酸の分子種の比率が KD 摂取群の肝臓にて低下していることも明らかとなった。詳細な解析の結果、KD 摂取による高血糖の改善により、脂肪酸合成酵素の発現量が低下することで、肝臓での脂質合成が抑制され、この効果により脂肪

肝形成が抑制されていることを明らかにした。この成果は、*ob/ob* マウスでは食餌による脂質の摂取よりも、糖質の過剰摂取に伴う脂質合成が脂肪肝の形成を促進することを示しており、糖質摂取制限による脂肪肝形成の抑制効果を支持する新規な知見である。

(3) O-GlcNAc 化タンパク質の解析

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マウスの臓器/組織試料を用いて、O-GlcNAc 化タンパク質の濃縮画分を調製した。調製した試料を用いて、ELISA 及びウエスタンブロッティングにより試料中の O-GlcNAc 化タンパク質の発現量を半定量的に解析可能な評価法を確立した。確立した評価法により、肝臓、腎臓、膵臓、筋肉、脂肪組織から調製した試料をそれぞれ解析したところ、O-GlcNAc 化タンパク質の総量については 2 群間に有意な差が確認されなかった。一方で、ウエスタンブロット法による分離解析により、各組織中にて検出される主要な O-GlcNAc 化タンパク質のうち、一部の O-GlcNAc 化タンパク質の発現量が、2 群間にて変化していることを見いだした。代表例として、肝臓のウエスタンブロット像を図 3 に示す。

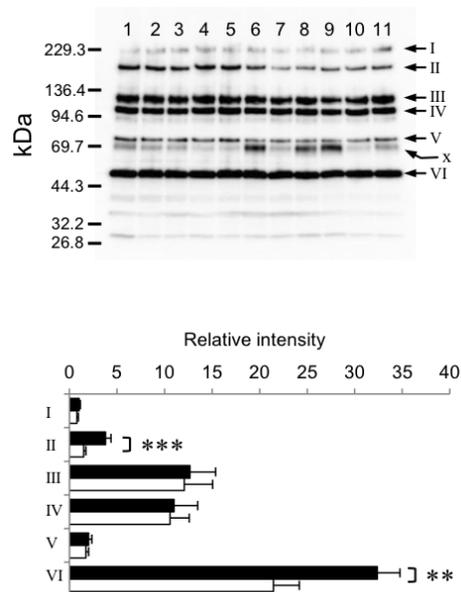


図 3 : 肝臓試料のウエスタンブロット解析

上図 : 肝臓試料のウエスタンブロット像

レーン 2~6 は、通常食摂取群の *ob/ob* マウス由来試料、レーン 7~11 は、KD 摂取群の *ob/ob* マウス由来試料。レーン 1 は、比較対象として、通常食を摂取させた野生型マウス由来試料をロードした。抗 O-GlcNAc 抗体にて検出される主要なバンドを矢印 (I~VI)

で示す。矢印 x は、検出に用いた二次抗体によるバックグラウンド (IgM) を示す。

下図：矢印 (I-VI) で示した各バンドのシグナル強度のグラフ。■：通常食摂取群、□：KD 摂取群、means ± S.E., n = 9, ** P < 0.01, *** P < 0.001 (Student's t-test)

肝臓で検出された主要な O-GlcNAc 化タンパク質のうち、矢印 II と VI で示した O-GlcNAc 化タンパク質は、高血糖の持続的改善後にその発現レベルが有意に低下しており、特に II の O-GlcNAc 化タンパク質では、著明な発現量の低下が確認された。同様に、他の臓器/組織試料中においても、高血糖の改善により発現量が有意に変化する O-GlcNAc 化タンパク質が幾つか確認された。

高血糖の改善により O-GlcNAc 化タンパク質の発現量が変化するメカニズムについても検討した。本研究期間では、特にタンパク質の O-GlcNAc 化を触媒する酵素 (O-GlcNAc 転移酵素) 及び分解する酵素 (O-GlcNAcase) の発現量に着目し、ELISA 法によりこれら酵素の発現量を解析した。その結果、O-GlcNAc 転移酵素と O-GlcNAcase は、ほとんどの組織において 2 群間で同等に発現していたが、肝臓では高血糖の改善にともない O-GlcNAc 転移酵素の発現量が有意に低下していた。この結果は、肝臓では高血糖の改善によりこの酵素が減少し、細胞内のタンパク質の O-GlcNAc 化が起こりにくくなっていることを示す。よって酵素活性の影響を受けやすい一部の基質タンパク質において O-GlcNAc 化レベルが低下し、このような変化が起きた可能性がある。一方、肝臓では高血糖の改善により発現量が低下するタンパク質が確認されており、見いだした O-GlcNAc 化タンパク質の発現量の低下は、基質タンパク質自体の発現量の低下を反映している可能性もある。

結論として、本研究では、食餌による高血糖の改善モデルを用いて、マウス主要な臓器に発現する O-GlcNAc 化タンパク質のうち、特定のタンパク質のみの発現量が血糖値レベルを反映して変化することを見いだした。ヒトの糖尿病患者由来赤血球試料を用いた解析でも、特定のタンパク質における O-GlcNAc 化のみが血糖値を反映して変化することが確認されており (Wang, Z., et al. Diabetes, 58, 309-317, 2009)、今回確立したモデルマウスの表現型と一致する。よって、確立したモデルでは目的とするマーカーの開発に適した体内環境を構築できていると考えられる。また、肝臓にて検出された O-GlcNAc 化タンパク質のうち、特に矢印 II で示した O-GlcNAc 化タンパク質は、高血糖の持続的改善下においてその発現レベルが

著明に低下していた。この性質から、この O-GlcNAc 化タンパク質は、本研究の目的とする糖尿病の改善効果を評価するための指標物質となる可能性がある。そこで現在、その実体同定に向けた解析や、イムノアッセイによる評価法の確立について、引き続き検討を進めている。

また、本研究では確立したモデルマウスの病理解析により、ob/ob マウスの主要な表現型である脂肪肝の形成が、食餌による持続的な高血糖の改善により抑制されていることも見いだした。メタボリックシンドロームの予防及び改善に糖質の摂取制限がどの程度効果的であるかはよくわかっていなかったが、本研究の成果により、脂肪肝の予防における糖質制限食の効果の科学的根拠が示された。

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 1 件)

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 and Diabetes (査読有)、2012、2、e50、DOI: 10.1038/nutd.2012.24

[学会発表] (計 3 件)

- ① 奥田徹哉、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)
- ② 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、鹿児島市民ホール(鹿児島県)
- ③ 奥田徹哉、摂食による血糖値コントロールが組織におけるタンパク質の発現および糖化修飾レベルに及ぼす影響、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、国立京都国際会館(京都府)

[図書] (計 1 件)

奥田徹哉、近江谷克裕、新機能抗体開発ハンドブック、エヌ・ディー・エス、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：特願 2013-096860
出願年月日：平成 25 年 5 月 2 日
国内外の別：国内

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：特願 2013-096866
出願年月日：平成 25 年 5 月 2 日
国内外の別：国内

〔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/research.html>

6. 研究組織

(1) 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