

FoxO1 による ChREBP の O-グリコシレーション調節を介した 肝糖代謝制御機構の解明

群馬大学 生体調節研究所 代謝シグナル解析分野
北村 忠弘

1. 研究目的

2型糖尿病の重要な病態に膵β細胞障害がある。β細胞が長期間高濃度グルコースに暴露されると、酸化ストレスからβ細胞障害が惹起され、糖毒性と呼ばれている。糖毒性の発症機序は未だ不明な点が多いが、解糖系の亢進が原因となることが報告されている。転写因子 ChREBP は解糖系の酵素である L-PK や脂質合成系の FAS、ACC の転写を調節している。しかしながら、ChREBP の研究はあまりされておらず、ChREBP の調節メカニズムは不明である。一方、申請者はこれまでインスリンシグナルの下流で制御されている転写因子 FoxO1 に注目して研究を行ってきた。申請者の予備検討においては、FoxO1 は L-PK、FAS、ACC の遺伝子発現レベルを抑制するという結果が得られたが、そのメカニズムについては不明であった。そこで本研究課題においては、FoxO1 が ChREBP の調節に関与することで、β細胞の糖毒性に関与する可能性を検討した。

2. 研究方法

まず、ChREBP のグルコースによる制御メカニズムをβ細胞と肝細胞を用いて検討した。ChREBP の発現レベルは RNA レベルとタンパクレベルの両方で評価した。次に、マウスの肝臓における ChREBP の発現を検討した。マウスを絶食、及び再摂食にして肝臓における ChREBP の発現量を調査すると共に、高脂肪食にて飼育したマウスと普通食飼育のマウスの肝臓における ChREBP を比較検討した。一方、ChREBP がグルコースによりタンパク質修飾されるかどうかを、種々のタンパク修飾（リン酸化、アセチル化、O-グリコシレーション、ユビキチン化）において検討した。また、転写因子 FoxO1 と ChREBP の関連について検討を行った。培養肝細胞に恒常的活性型の FoxO1 (FoxO1-ADA) をアデノウイルスを用いて強制発現させた場合の ChREBP の発現レベルを検討した。さらに、FoxO1 が ChREBP のタンパク修飾を調節するかどうかを検討した。一方、申請者が所有する FoxO1 flox マウスと Albumin-cre マウスを交配することで、肝臓特異的 FoxO1 ノックアウトマウスを作製し、これらのマウスの肝臓における ChREBP の O-グリコシレーション、ユビキチン化、タンパク量の変化を調査した。

3. 研究結果と考察

まず、ChREBP の制御メカニズムを検討した所、β細胞や肝細胞を高グルコースで培養すると、ChREBP のタンパク量が増加することを見出した。この増加に RNA レベルの変化は伴っていなかった。また、マウスを絶食と摂食の状態では肝臓における ChREBP のタンパク量を比較すると、摂食時

に増加することを確認した。高脂肪食にて飼育したマウスでは絶食時に既に ChREBP 量が増加しており、摂食による変化は消失していた。次に、ChREBP のタンパク質修飾を検討した所、高グルコースにより強く O-グリコシレーション修飾を受けることが明らかとなった。ChREBP の O-グリコシレーションは O-GlcNAc transferase (OGT) によって惹起され、siRNA によって OGT をノックダウンすると、高グルコースによる ChREBP の O-グリコシレーションは抑制された。逆に ChREBP の O-グリコシレーションは O-GlcNAcase (GCA) によって抑制された。さらに ChREBP が O-グリコシレーション修飾を受けることで、ChREBP のユビキチン化が低下し、その結果として ChREBP のタンパク量が増加することを明らかにした。次に、転写因子 FoxO1 と ChREBP の関連について検討を行った。肝細胞に恒常的活性型の FoxO1 (FoxO1-ADA) を強制発現させると、ChREBP のタンパクレベルが有為に減少した。また、FoxO1 は ChREBP の O-グリコシレーションを抑制することで、ユビキチン化が亢進し、タンパク量が減少するというメカニズムを明らかにした。一方、FoxO1 flox マウスと Albumin-cre マウスを交配させることで肝臓特異的 FoxO1 ノックアウトマウスを作製した所、これらのマウスの肝臓で ChREBP の O-グリコシレーションの亢進、ユビキチン化の減少、タンパク量の増加が確認できた。以上より、(1) β 細胞や肝細胞で脂肪合成系酵素の転写に関わる ChREBP の新しい調節メカニズムとして、O-グリコシレーション、ユビキチン化によるタンパクレベルでの調節メカニズムを明らかにした。(2) インスリンシグナル下流で制御されている転写因子 FoxO1 が ChREBP の O-グリコシレーションを抑制することで、タンパク量の調節に関与していることを明らかにした。これらの成果は、細胞内脂質代謝調節におけるグルコースとインスリン作用をリンクさせる新しい分子メカニズムを提唱するものであり、今後 FoxO1 と ChREBP の2つの分子をターゲットにして脂質代謝関連薬、糖毒性改善薬の開発につながることを期待している。

4. まとめ

膵 β 細胞の糖毒性発症に解糖系酵素の遺伝子転写を調節している ChREBP が関与している可能性が示唆されているが、ChREBP 自体の調節メカニズムは不明であった為、本研究課題において、これを検討した。その結果、ChREBP は O-グリコシレーションとユビキチン化によるタンパクレベルで調節されていること、さらに FoxO1 が ChREBP の O-グリコシレーションを抑制することで、その調節に関与していることが明らかとなった。これらの成果は、今後の糖毒性改善を目的とした新規糖尿病薬の開発に貢献する可能性がある。

5. 研究発表

学会発表

69th Scientific Session of American Diabetes Association (June, 2009)

Regulation of hepatic glycolysis by FoxO1 via ChREBP O-glycosylation

Tadahiro Kitamura, Yukari Kitamura and Domenico Accili. *Maebashi, Gunma, Japan; New York, NY*