



0-GlcNAcylation of myocyte-specific enhancer factor 2D negatively regulates insulin secretion from pancreatic β -cells

吉田，舞

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8393号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477819>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

O-GlcNAcylation of myocyte-specific enhancer factor 2D negatively regulates insulin secretion from pancreatic β -cells

Myocyte-specific enhancer factor 2D の O-GlcNAc 化は
脾 β 細胞からのインスリン分泌を抑制的に制御する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
糖尿病・内分泌内科学
(指導教員: 小川 渉教授)

吉田 舞

【背景】2型糖尿病患者において、グルコース応答性インスリン分泌およびインクレチン応答性インスリン分泌はしばしば障害されている。このような病態は脾 β 細胞の糖代謝の変化と関係しているが、その分子メカニズムは不明である。これまでの研究から、グルコースにより誘導されるタンパク質の翻訳後修飾である O-結合型 N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 化が、糖尿病に関係していることが知られている。ヘキソサミン生合成経路 (HBP) は解糖系から分岐し、UDP-GlcNAc を最終産物として生成し、それが O-GlcNAc 化の基質となる。細胞内のグルコース濃度が上昇すると、HBP へ流れ込む基質も増え、タンパク質の O-GlcNAc 化が増強する。脾 β 細胞は O-GlcNAc 化の基質とその転移酵素を高レベルで有しており、O-GlcNAc 化は脾 β 細胞の機能に重要であることが示されている。さらに、2型糖尿病モデル動物である Goto-Kakizaki ラットの脾島においてグルコース応答性インスリン分泌は O-GlcNAc 化の増強により減弱することから、O-GlcNAc 化はインスリン分泌の制御において重要な役割を担うと考えられる。O-GlcNAc 化を受けるセリンとスレオニン残基は PKA によるリン酸化を受けるアミノ酸でもあり、両者は競合する可能性がある。PKA 依存性リン酸化はグルコース応答性インスリン分泌およびインクレチン応答性インスリン分泌の両者において重要な役割を果たすことから、O-GlcNAc 化の増強により PKA の効果が阻害され、インスリン分泌が減弱する可能性がある。以上のことから、脾 β 細胞において O-GlcNAc 化と PKA 依存性リン酸化が競合するタンパク質が糖尿病の病態発症の基盤であるインスリン分泌障害に関与している可能性が考えられた。

【目的】本研究では、脾 β 細胞を対象とした免疫沈降プロテオーム解析により、O-GlcNAc 化を介してインスリン分泌障害に関与するタンパク質を同定することを目的とした。

【方法】肥満糖尿病モデル ZFDM ラットの脾島における O-GlcNAc 化の程度を、抗 O-GlcNAc 抗体を用いたウエスタンプロット解析により評価した。高濃度グルコースおよび O-GlcNAc 分解酵素 (OGA) の阻害剤 PUGNAc の処置による MIN6-K8 脾 β 細胞株の O-GlcNAc 化の程度を、抗 O-GlcNAc 抗体を用いたウエスタンプロット解析により評価した。また、脾 β 細胞株を PUGNAc の処置により O-GlcNAc 化を増強させた条件下でエキセンディン 4 による PKA 依存性リン酸化を抗 Phospho - (Ser / Thr) PKA substrate 抗体を用いたウエスタンプロット解析により評価した。さらに、培養液中に高濃度グルコース、あるいは高濃度グルコースとエキセンディン 4 の同時添加した条件下で β 細胞株を培養した後、細胞溶解液を調整した。それぞれの溶解液を抗 O-GlcNAc 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE 後に銀染色を行った。ゲルを 24 分割し、ゲル内消化のあと、質量分析 (LC-MS/MS) 解析に供した。SwissProt のデータベースを用いて検出したタンパク質を同定した。検出されたタンパク質において O-GlcNAc 化を受ける可

能性があるアミノ酸残基を O-GlcNAc 修飾予測部位のデータベース（OGTsite、YinOYang 1.2）で検索した。PKA 依存性リン酸化を受けるアミノ酸残基を PKA 依存性リン酸化予測部位データベース（Netphos 3.1）で検索し、両者の残基が一致する候補タンパク質を同定した。それらの候補タンパク質について、siRNA によるノックダウンのインスリン分泌に対する効果を調べた。ノックダウンによりインスリン分泌に影響が見られた Mef2d (Myocyte-specific enhancer factor 2D) の MIN6-K8 細胞での O-GlcNAc 化の程度を、高濃度グルコース、PUGNAc、エキセンディン 4 でそれぞれ処置を行った後に抗 Mef2d 抗体で免疫沈降し、抗 O-GlcNAc 化抗体を用いて評価した。さらに、Mef2d のノックアウト細胞を CRISPR-Cas9 システムを用いて作製するとともに、Mef2d 発現アデノウイルスを用いたレスキュー実験によりインスリン分泌における役割を検討した。

【結果】ZFDM ラットの肥大脾島では、O-GlcNAc 化の亢進が認められた。MIN6-K8 細胞を用いた検討では、低濃度グルコース培地で培養した細胞と比較し、高濃度グルコースおよび PUGNAc の処置により O-GlcNAc 化が増強された。また、PUGNAc の処置により O-GlcNAc 化を亢進させた MIN6-K8 細胞では、エキセンディン 4 による PKA 依存性リン酸化の減弱がみられた。免疫沈降プロテオーム解析では、高濃度グルコース条件下で抗 O-GlcNAc 抗体により免疫沈降されるが、エキセンディン 4 刺激下で免疫沈降されないタンパク質が 20 個同定された。これらのタンパク質のうち、O-GlcNAc 化修飾を受ける可能性があるアミノ酸残基と、PKA 依存性リン酸化を受ける可能性があるアミノ酸残基が一致しているタンパク質を検索した結果、6 つの候補タンパク質を同定した。このうち、Mef2d をノックダウンした場合にグルコース応答性インスリン分泌の増強が認められた。高濃度グルコースおよび PUGNAc 処置により、Mef2d の O-GlcNAc 化の増強が確認された。さらに、Mef2d ノックアウト細胞においてグルコース応答性インスリン分泌の増強が認められ、Mef2d 発現アデノウイルスを用いたレスキュー実験では、その増強の減弱がみられた。

【考察】本研究では、免疫沈降プロテオミクスの手法を用いて O-GlcNAc 化と PKA 依存性リン酸化が競合しうる 6 つのタンパク質を同定した。我々の知る限りでは、これは脾 β 細胞において O-GlcNAc 化タンパク質を免疫沈降プロテオミクスの手法を用いて網羅的に検索した初めての研究である。この手法は翻訳後修飾により機能が制御されるタンパク質の同定に非常に有用であると考えられる。

ノックダウン、ノックアウト、アデノウイルスを用いたレスキュー実験より、Mef2d はインスリン分泌を抑制的に制御すると考えられた。Mef2d は転写因子である MADS ファミリーに属するアイソフォームの 1 つである。Mef2d は当初筋形成において重要な役割を果たすことが報告されたが、その後の研究により神経細胞などで様々な役割

を果たすことが報告されている。しかし、脾 β 細胞における Mef2d の役割はほとんど明らかでない。今回の研究で、Mef2d は高濃度グルコースにより O-GlcNAc 化され、インスリン分泌を抑制する働きがあることが示された。しかしながら、今回の研究では Mef2d において、O-GlcNAc 化と PKA 依存性リン酸化が競合する直接の証拠を示すことはできなかった。さらに、Mef2d の翻訳後修飾とインスリン分泌の直接の関係を示すこともできなかった。しかしながら、Mef2d の O-GlcNAc 化が筋形成において重要な遺伝子の発現を制御することや、PKA 依存性リン酸化により Mef2d の転写因子活性が抑制されることが海馬細胞などで既に報告されており、Mef2d の DNA 結合ドメインおよび転写活性化ドメインに O-GlcNAc 化部位が存在することも報告されている。今回我々の予測した 2 つの翻訳後修飾の競合部位はこれまでに報告されている PKA 依存性リン酸化の部位とは異なっているが、Mef2d の転写活性化ドメインに位置し、これら 2 つの翻訳後修飾が競合し標的遺伝子の転写を調整することによってインスリン分泌を制御している可能性が考えられる。Mef2d のインスリン分泌における制御メカニズムについては、さらなる検討が必要である。

今回我々は、免疫沈降プロテオーム解析により同定された他の 5 つのタンパク質については詳細な検討を行わなかった。脾 β 細胞におけるこれらのタンパク質の O-GlcNAc 化についてはこれまで報告されておらず、これらのタンパク質の O-GlcNAc 化のインスリン分泌における役割について検討することも、興味深いと考えられる。

【結語】MIN6-K8 細胞において、O-GlcNAc 化と PKA 依存性リン酸化が競合しうる 6 つのタンパク質を同定した。これらのタンパク質のうち、Mef2d は O-GlcNAc 化を介してインスリン分泌を抑制的に制御する働きがあると考えられた。Mef2d のインスリン分泌における詳細なメカニズムを解明することは、インスリン分泌メカニズムや、糖尿病の治療戦略の発展に新しい知見を与える可能性がある。

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3184 号	氏名	吉田 舞
論文題目 Title of Dissertation	O-GlcNAcylation of myocyte-specific enhancer factor 2D negatively regulates insulin secretion from pancreatic β -cells Myocyte-specific enhancer factor 2D の O-GlcNAc 化は胰 β 細胞からのインスリン分泌を抑制的に制御する		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 田中 健一 副査 Vice-examiner 田守 義和 副査 Vice-examiner 西慎一		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【目的】 2型糖尿病患者において、グルコース応答性インスリン分泌およびインクレチン応答性インスリン分泌はしばしば障害されている。このような病態は胰 β 細胞の糖代謝の変化と関係しているが、その分子メカニズムは不明である。これまでの研究から、グルコースにより誘導されるタンパク質の翻訳後修飾である O-結合型 N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 化が、糖尿病に関係していることが知られている。O-GlcNAc 化を受けるセリンとスレオニン残基は PKA によるリン酸化を受けるアミノ酸であり、両者は競合する可能性がある。PKA 依存性リン酸化はグルコース応答性インスリン分泌およびインクレチン応答性インスリン分泌の両者において重要な役割を果たすことから、O-GlcNAc 化の増強により PKA の効果が阻害され、インスリン分泌が減弱する可能性がある。以上のことから、申請者らは、胰 β 細胞において O-GlcNAc 化と PKA 依存性リン酸化が競合するタンパク質が糖尿病の病態発症の基盤であるインスリン分泌障害に関与する可能性を考え、O-GlcNAc 化を介してインスリン分泌障害に関与するタンパク質を同定することを目的に研究を行った。

【方法と結果】

肥満糖尿病モデル ZFDM ラットの胰島および MIN6-K8 細胞での O-GlcNAc 化の程度を、抗 O-GlcNAc 抗体を用いたウエスタンプロット解析により評価した。免疫沈降プロテオーム解析により、O-GlcNAc 化と PKA 依存性リン酸化が競合する候補タンパク質を同定した。siRNA によるノックダウンによりインスリン分泌に影響が見られた Mef2d (Myocyte-specific enhancer factor 2D) の MIN6-K8 細胞での O-GlcNAc 化の程度を、抗 Mef2d 抗体で免疫沈降し、抗 O-GlcNAc 化抗体を用いて評価した。さらに、Mef2d のノックアウト細胞を CRISPR-Cas9 システムを用いて作製するとともに、Mef2d 発現アデノウイルスを用いたレスキュー実験によりインスリン分泌における役割を検討した。

ZFDM ラットの肥大胰島では、O-GlcNAc 化の亢進が認められた。MIN6-K8 細胞を用いた検討では、低濃度グルコース培地で培養した細胞と比較し、高濃度グルコースおよび O-GlcNAc 分解酵素 (OGA) の阻害剤 PUGNAc の処置により O-GlcNAc 化が増強された。また、PUGNAc の処置により O-GlcNAc 化を亢進させた MIN6-K8 細胞では、エキセンディン 4 による PKA 依存性リン酸化の減弱がみられた。

申請者らは、培養液中に高濃度グルコース、あるいは高濃度グルコースとエキセンディン4の同時添加した条件で β 細胞株を培養した後、細胞溶解液を抗O-GlcNAc抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE後に銀染色を行い質量分析に供した。その結果、高濃度グルコース条件下で抗O-GlcNAc抗体により免疫沈降されるが、エキセンディン4刺激下で免疫沈降されないタンパク質を20個同定した。検出されたタンパク質においてO-GlcNAc化を受ける可能性があるアミノ酸残基をO-GlcNAc修飾予測部位のデータベースで検索した。PKA依存性リン酸化を受けるアミノ酸残基をPKA依存性リン酸化予測部位データベースで検索した結果、両者の残基が一致する6つの候補タンパク質を同定した。それらの候補タンパク質について、siRNAによるノックダウンのインスリン分泌に対する効果を調べたところ、Mef2dをノックダウンした場合にグルコース応答性インスリン分泌の増強が認められた。高濃度グルコースおよびPUGNAc処置により、Mef2dのO-GlcNAc化の増強が確認された。さらに、CRISPR-Cas9システムを用いて作製したMef2dノックアウト細胞においてグルコース応答性インスリン分泌の増強が認められ、Mef2d発現アデノウイルスを用いたレスキュー実験では、その増強の減弱がみられた。

【結論】申請者らは、Mef2dがO-GlcNAc化を介してインスリン分泌を抑制的に制御することを示し、新しい治療法の開発につながる可能性を示した価値ある研究である。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。