

報告番号	甲 ㊦ 第	号	氏 名	城 理 絵
主 論 文 題 名				
Mechanisms of mineralocorticoid receptor-associated hypertension in diabetes mellitus: the role of O-GlcNAc modification (糖尿病におけるミネラルコルチコイド受容体関連高血圧のメカニズム：O-GlcNAc修飾の役割)				
(内 容 の 要 旨)				
近年、レニン-アンジオテンシン系阻害薬投与下の糖尿病性腎症に対し、ミネラルコルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor: MR) 拮抗薬の追加投与により腎症の進行および心血管イベントの発症リスクを低減できたことが報告されている。糖尿病のように高アルドステロン血症を呈さない場合でもMR拮抗薬が有用な病態、すなわちMR関連高血圧 (Shibata H et al, Am J Hypertens. 2012; 25) の一つの機序として、MRの発現量増加や翻訳後修飾によるアルドステロン感受性の亢進が推定される。そこで、本研究では糖尿病におけるMR活性亢進の新たな分子機序を解明することを目的とし、高血糖環境で誘導されるO-linked β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) 修飾に注目して検討を行った。この糖鎖修飾は2型糖尿病の病態と深く関連していることが知られている。MRにおけるO-GlcNAc修飾の意義について、以下の検討を行った。 - MR発現量と転写活性：MR遺伝子を導入したCOS7細胞, HEK293細胞を5-30mM glucose培地で培養し、O-GlcNAc修飾を促進するO- (2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc) 処置や O-GlcNAc transferase (OGT) 過剰発現、同修飾を抑制する6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) 処置、O-GlcNAcase (OGA) 過剰発現を行った。luciferase assay, 定量RT-PCR, western blotにて検討を行った。30mMグルコース、PUGNAc処置、OGT過剰発現により10^{-10}Mアルドステロンを介したMR転写活性は1.3-3倍上昇し、MRの標的遺伝子である内因性SGK1のmRNAとMR蛋白発現量は有意に増加した。一方、DON処置、OGA過剰発現によりMR転写活性は約75%低下しMR蛋白発現量は減少した。 - MRのO-GlcNAc修飾の検出と修飾残基の同定: 1.と同様の処置を行い回収したMRタンパク質について、免疫共沈降法を行いO-GlcNAc修飾を検出した。MRのO-GlcNAc修飾は30mMグルコース処置で増強していた。さらにFlag-MR蛋白を精製し、in vitroでのOGT反応生成物を質量分析法 (LC-MS/MS) で解析したところ、MRの295-307アミノ酸のO-GlcNAc修飾が示された。O-GlcNAc修飾はセリン、スレオニン残基で見られるため、この領域内のセリン残基変異体を作成した。このうち、S295A MR, S298A MR, S299A MRでO-GlcNAc修飾の減少とともにタンパク質発現量の減少を認め、これらの転写活性は野生型の20-60%に低下していた。以上より、上記3残基のO-GlcNAc修飾がMRのタンパク質安定化に関わり、その転写活性を正の方向に調節していることが示された。 2型糖尿病モデルでの検討: db/dbマウス、対照群のdb/+マウスについて、腎、大腸組織におけるMR蛋白発現量、O-GlcNAcレベル、MR標的遺伝子のmRNA量を検討した。血糖値及び血圧はdb/db群で有意に高値であった。db/dbマウスの血漿アルドステロン濃度は対照群と同等であった。db/db群ではSGK1のmRNAが有意に増加しており、腎組織のO-GlcNAcレベルの増加とともにMRタンパク質発現量が対照群の2.5倍に増加していた。一方、MRのmRNAレベルは両群で差がなく、MRの発現量が蛋白レベルで調節されていることが示唆された。さらに、上記2群にDONを5日間腹腔内投与したところ、MRの発現量は50%減少したが、mRNAについてはDON投与群、非投与群で有意な差を認めなかった。 以上より、本研究ではMRのO-GlcNAc修飾がMRの転写活性の制御に重要な役割を果たすことを初めて見出した。糖尿病において、O-GlcNAc修飾の増加によりMR蛋白が安定化し、アルドステロン感受性が亢進することがin vitroおよびin vivoにおいて示された。本研究は、糖尿病におけるMR拮抗薬の有効性について、新たな分子機構を明らかにした。				