

マクロファージの炎症性応答における O-結合型N-アセチルグルコサミン修飾の生理的役割

白 土 健

杏林大学医学部衛生学公衆衛生学教室

細胞内に取り込まれたグルコースのうち、2～3%はヘキソサミン生合成経路で代謝される。最終代謝産物N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) は、核酸UDPが付加された後、種々の糖鎖修飾のドナー基質として用いられる。O-結合型GlcNAc (O-GlcNAc) 修飾は、主にシグナル伝達タンパク質や転写因子の特定のセリン/スレオニン残基にGlcNAcを付加する反応であり、O-GlcNAc転移酵素(OGT)によって触媒されている。

高血糖になると、ヘキソサミン生合成経路の代謝量が増大し、UDP-GlcNAcレベルの上昇に伴ってOGTの活性も高まる。特に、膵β細胞では、インスリン受容体下流の各種シグナル伝達タンパク質のO-GlcNAc修飾が亢進し、リン酸化カスケードが阻害されるため、インスリン抵抗性の病態形成への関与が示唆されている。

一方、自然免疫を担うマクロファージ (MΦ) は、病原体をToll様受容体で認識することで、多様な炎症性メディエータの発現と分泌を引き起こす。しかし、MΦの炎症性応答における正常血糖時のO-GlcNAc修飾の生理的役割は不明である。生体感染防御能は栄養不良で低下するが、この不明な点が明らかになれば、将来的には、MΦの殺菌能における糖質の重要性とそのメカニズムを個体から分子までのレベルで解明できることが期待される。

本研究では、リポ多糖 (LPS) による炎症性メディエータの発現誘導に対するOGTの阻害剤とノックダウンの影響およびそのメカニズムについて、マウスMΦ細胞株RAW264.7を用いて検討し、以下の知見を得た。

1. LPSによる炎症性メディエータの発現誘導に対するOGTの阻害剤とノックダウンの影響

RAW264.7にOGT阻害剤OSMI-1を作用させてO-GlcNAc修飾を抑制すると、LPSによる誘導型一酸化窒素(NO)合成酵素(iNOS)のmRNA発現誘導は影響を受けなかったが、そのタンパク質発現誘導とNO分泌が減弱した。近

年同定された阻害剤OSMI-4を作用させた場合や、OGTをノックダウンした場合でも、同様の結果が得られた。一方、LPSによる炎症性サイトカインTNF-αの発現誘導は、mRNAおよび分泌レベルのいずれも減弱していなかった。これらの結果から、OGTおよびO-GlcNAc修飾は、iNOSのmRNAからタンパク質への翻訳に不可欠であることが示唆された。

2. OGTノックダウンによるiNOSタンパク質発現誘導の抑制に対するL-アルギニン補充の効果

iNOSはL-アルギニンを基質としてNOを合成する。加えて、L-アルギニンはiNOSのmRNAからタンパク質への翻訳を促進する働きがあることも報告されている (Lee, J., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100: 4843-4848, 2003)。そこで、L-アルギニンを介したiNOSの翻訳促進機構に対するO-GlcNAc修飾の保護作用の有無を明らかにするため、L-アルギニン補充の効果を検討した。その結果、OGTノックダウンによるiNOSタンパク質発現誘導の抑制は、L-アルギニン補充によって回復することがわかった。

3. アルギナーゼの酵素活性に対するOGTの阻害剤とノックダウンの影響

細胞内のL-アルギニンレベルは、その代謝を担っているアルギナーゼの酵素活性の影響を受けている。そこで、アルギナーゼの酵素活性に対するOGT阻害剤OSMI-4とOGTノックダウンの影響を検討した結果、いずれの場合でも、その活性は有意に上昇することがわかった。一方、アルギナーゼの発現量は変化していなかったことから、OGTはアルギナーゼに直接作用してその酵素活性を抑制していることが示唆された。

4. アルギナーゼと OGT の相互作用および アルギナーゼの O-GlcNAc 修飾の有無

RAW264.7 から全タンパク質を抽出し、免疫沈降法で精製したアルギナーゼを電気泳動法で分離した後、ウェスタンブロット法で分析した結果、OGT が共沈されていることが明らかになった。アルギナーゼの O-GlcNAc 修飾の有無を明らかにするため、アルギナーゼが局在するミトコン

ドリアタンパク質をサンプルとして用いる、あるいはアルギナーゼの強発現株を樹立するなどの方法を用いて、引き続き検討を行っていく。

以上より、OGT はアルギナーゼの酵素活性を抑制することで、iNOS の翻訳に必要な細胞内の L-アルギニンレベルを保つ働きをしており (図 1)、MΦ の感染防御機能における OGT および O-GlcNAc 修飾の重要性が示唆された。

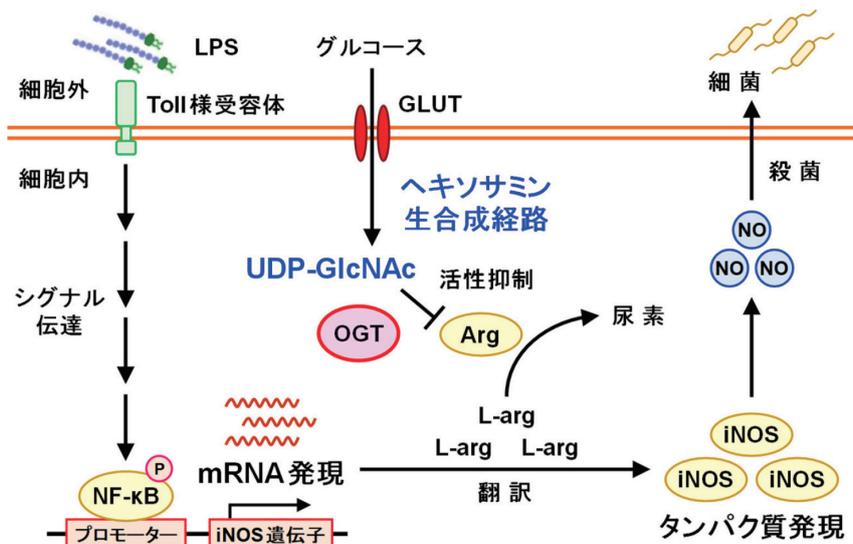


図 1 マクロファージの炎症性応答における O-GlcNAc 修飾の生理的役割