

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成15年度採択研究代表者

井ノ口 仁一

(北海道大学大学院薬学研究科 助教授)

## 「マイクロドメイン機能異常にもとづく2型糖尿病の病態解明」

### 1. 研究実施の概要

糖尿病などの生活習慣病の発症には、種々サイトカインを初めとする様々な細胞外からの刺激の結果としての遺伝子発現変化が深く関わっている。しかしながら、個々のサイトカインレベルを測定する病態診断等では、種々の細胞外刺激の総合的結果としての病態評価には限界があり、さらなる情報データベースの構築が望まれている。スフィンゴ糖脂質 (GSL) は、ポスト・ポストゲノム研究の重要課題である複合糖質ファミリーに属し、細胞外からのシグナル伝達を中心とする細胞膜マイクロドメインに集積してシグナル伝達を制御している事実が明らかにされてきている。我々は、TNF $\alpha$ により惹起される2型糖尿病におけるインシュリン抵抗性には、ガングリオシドGM3合成酵素遺伝子発現が誘導され、増加したGM3はマイクロドメインを介したインシュリンシグナルを抑制することを世界に先駆けて証明した。このように、GSL発現変化は生活習慣病の病態に深く関わっており、さらに我々はGSLの変化そのものが特定の遺伝子発現を制御していることを証明している。GM3発現増加によるインシュリン抵抗性の発症機序のさらなる解明を目指して以下の検討を実施中である。インシュリンがインシュリン受容体 (IR) に結合すると、IRの自己リン酸化に続いてIRのインターナリゼーションが起こり、細胞内即ちエンドソームにおいてアダプター蛋白であるIRSとの会合およびIRSのチロシンリン酸化が数分以内に起こる。IRSのリン酸化はPI3 kinaseをリクルートし、GLUT4の細胞膜への移行が起こり、糖の取込みが促進される。そこで、インシュリン刺激後のIRおよびIRS-1の細胞内動態をTNF処理、無処理細胞において検討したところ、TNF処理脂肪細胞ではインシュリン刺激に伴うIRのエンドソームへのインターナリゼーションおよびIRS-1のエンドソームへの集積が未処理脂肪細胞と比較して著しく抑制されていた。次に、TNFによるインシュリン受容体 (IR) のマイクロドメインへの局在を検討したところ、TNF処理脂肪細胞では、未処理3T3-L1脂肪細胞で認められたIRのマイクロドメインへの局在はほとんど認められなかった。これらの結果から、TNF処理脂肪細胞ではIRのマイクロドメインへの局在が消失し、インシュリン刺激によるIRのインターナリゼーションが起こらないために、細胞内アダプター蛋白であるIRS-1とIRとの細胞内シグナル伝達形成が抑制されていることが強く示唆された。この発見により、2型糖尿病におけるインシュリン抵抗性の病態にはマイクロドメインの異

常、即ち、IRのマイクロドメインへの局在化の消失が関与していることが強く示唆された。そこで、15年度ではin vitroおよびin vivoにおけるインスリン抵抗性発症機序におけるGM3およびマイクロドメインの関与を解析するための基盤を確立するため下記の内容を検討実施した。

- 1) 肥満/インスリン抵抗性病態モデル動物であるZucker *fa/fa* ラット, *ob/ob*および*db/db*マウスの脂肪組織, 筋肉および肝臓のスフィンゴ糖脂質 (GSL) 組成を正常組織と比較分析したところ、脂肪組織特異的にGM3の発現上昇が認められ、特にZucker *fa/fa* ラットではleanに比較して10倍の著しい上昇を確認し、in vivo における有力な研究対象を得た。
- 2) GM3のマイクロドメインへの過剰集積の影響を直接的に証明するため、SAT-I遺伝子導入アデノウイルスベクターの作製を完了した。
- 3) 高感度GSL関連遺伝子検出システム (GSLアレイ) の開発に成功した。
- 4) SAT-IのN型糖鎖は、酵素活性に必須である。しかし、ある特定のアミノ酸によって活性は維持出来ることを見いだした。この発見により、SAT-Iの活性中心の構造解析が進展するものと期待される。
- 5) GFP標識IRおよびRFP標識caveolin-1のプラスミドベクターを作成し、生細胞でのタイムラプス蛍光観察が可能になった。さらには、蛍光相互相関分析法 (FCCS) や蛍光エネルギー移動法 (FRET) によるIRとcaveolin-1のマイクロドメインにおける動態を検討する準備ができた。

## 2. 研究実施体制

### マイクロドメイン分子病態研究グループ

- ① 研究分担グループ長：井ノ口 仁一（北海道大学大学院薬学研究科、助教授）
- ② 研究項目：2型糖尿病におけるマイクロドメイン分子病態としてのGM3の関与を証明

### メタボローム・プロテオーム研究グループ

- ① 研究分担グループ長：鈴木 實（理化学研究所、研究員）
- ② 研究項目：マイクロドメインの解析（マススペクトルを用いた質量分析）

### 1 分子動態研究グループ

- ① 研究分担グループ長：金城 政孝（北海道大学電子科学研究所、助教授）
- ② 研究項目：1分子観察によるインスリン抵抗性脂肪細胞のマイクロドメイン動態検討

### 構造生物学研究グループ

- ① 研究分担グループ長：稲垣 冬彦（北海道大学大学院薬学研究科、教授）

② 研究項目：GM3合成酵素（SAT-I）の構造生物学