

## 「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

我々の研究到達目標は、「2 型糖尿病などの生活習慣病の病態は、スフィンゴ糖脂質の異常発現によって細胞膜（マイクロドメイン）の構成・構造および機能が変化し、シグナル伝達が異常になったマイクロドメイン病である」という作業仮説を検証し、新たな分子病態像を確立することである。特に、脂肪細胞におけるインスリン抵抗性状態はガングリオシド GM3 の過剰発現が原因であることを見いだし、その分子メカニズムとして、正常状態ではインスリン受容体は細胞膜内側で caveolin-1 と結合しカベオラマイクロドメインに存在するが、過剰の GM3 はインスリン受容体βサブユニットの細胞膜直上のリジン残基と相互作用し、caveolin-1 との結合を減弱させることを突き止めた。この発見は、インスリン受容体をはじめとする種々のチロシンキナーゼ受容体のマイクロドメイン局在化機構とそれらのガングリオシドによる機能制御機構の解明に繋がることが期待される。また、マイクロドメイン矯正療法開発の一環として、GM3 合成酵素 (SAT-I) の N-glycan 結合部位のアミノ酸を進化的に基づく特異的なアミノ酸に置換することにより、糖鎖が無くても酵素活性を維持している SAT-I タンパクの創出に成功したことから、SAT-I 立体構造解析の進展と特異的阻害剤の開発が期待される。

### 2. 研究実施内容

2 型糖尿病をはじめとする生活習慣病の発症には肥大化した脂肪細胞から分泌されるアデイポサイトカインの分泌異常が深く関わっている。中でも炎症性サイトカインである TNF  $\alpha$  などの脂肪組織からの分泌亢進は、インスリン抵抗性発症の原因となっている。我々は以前、低濃度の TNF  $\alpha$  で脂肪細胞を慢性的に処理してインスリン抵抗性を惹起させると、ガングリオシド GM3 合成酵素遺伝子および GM3 の発現が亢進することを見いだした。この TNF 処理脂肪細胞における insulin receptor (IR)-IRS-1 シグナリングの抑制は、GM3 合成の阻害により回復することから、GM3 の過剰発現はインスリン抵抗性を惹起する可能性を示唆した(1)。さらに脂肪細胞の caveolae microdomains の IR は、TNF  $\alpha$  による GM3 の発現亢進で解離することから、IR を介した代謝性シグナリングにおける caveolae および GM3 の関与を示唆し

た(2)。我々は、GM3によるIR-caveolin複合体形成抑制が脂肪細胞のインスリン抵抗性を惹起するという新たな病態像を提唱している。

今回、以下の項目について成果が得られた。

### 1) マイクロドメインにおけるインスリンシグナルの制御

IR、caveolin および GM3 の分子間相互作用を免疫沈降によって検討したところ、caveolin と GM3 は IR とそれぞれ独立した複合体を形成することが示された。さらに生細胞における蛍光分子イメージング法として FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) および TIRF (total internal reflection fluorescence) を用いて IR と caveolin の挙動を解析したところ、IR は caveolin と結合して共局在すること、GM3 高発現細胞の膜上では IR は caveulin から解離しての流動性が向上すること、GM3 のシアル酸は IR  $\beta$  subunit の細胞膜直上の塩基性アミノ酸リジンと相互作用することが示唆された。

### 2) インスリン受容体とガングリオシド GM3 の相互作用

そこで、インスリン受容体と GM3 の直接的相互作用を確認するため、ミラノ大学の Sandro Sonnino 教授とのマイクロドメインにおけるインスリン受容体とガングリオシドの相互作用における共同研究を行った。Sonnino 研究室で合成された光感受性放射標識ガングリオシド GM3 家業試薬を脂肪細胞に添加し、紫外線を照射後、インスリン受容体の抗体を用いた免疫沈降、Western blot およびオートラジオグラフィーによる検討によって、インスリン受容体とガングリオシド GM3 の架橋物を確認した。従って、世界に先駆けてガングリオシド GM3 がインスリン受容体と直接相互作用し、マイクロドメインにおけるインスリン受容体の機能を制御していることを証明した。次に、トリチウム標識スフィンゴシンで脂肪細胞のガングリオシドを代謝標識し、細胞膜マイクロドメイン凝集体を保持する 1%Triton X100, 4°Cで、インスリン受容体抗体 による免疫沈降を行ったところ、TNF 処理で GM3 とインスリン受容体の複合体は明らかに増加していた。この時、正常状態の脂肪細胞で検出されるインスリン受容体とカベオリン 1 の免疫沈降物が TNF 処理脂肪細胞ではほとんど検出されなかった。これらの結果により、インスリン抵抗性状態のマイクロドメインでは、ガングリオシド GM3 が増加し、インスリン受容体と GM3 の複合体の増加に伴い、インスリンの代謝性シグナルに必須であるインスリン受容体とカベオリンとの複合体形成が阻害されていることが、見事に証明できた。従って、これらの研究成果は我々が提唱している「脂肪細胞におけるインスリン抵抗性はガングリオシド GM3 が増加した結果惹起されるマイクロドメイン病である」作業仮説を証明する重要な証拠となった。

### 3) 糖鎖代替えアミノ酸置換法 (SUNGA)

マイクロドメイン矯正療法開発の一環として、GM3 合成酵素 (SAT-I) の立体構造の解明に基づく特異的阻害剤を開発するため、SAT-I の N-型糖鎖結合部位のアミノ酸配列を進化情

報に基づく特異的なアミノ酸に置換することにより、糖鎖が無くても酵素活性を維持している SAT-I タンパクの創出に成功した。mouse SAT-I に付加する糖鎖の意義を検証するために、CHO 細胞に一過性に発現させた ST3Gal-V の野生型及び変異体の酵素活性を *in vitro* で測定した。mST3Gal-V の糖鎖付加部位のアスパラギンをグルタミンに置換した変異体 (N180Q、N224Q、N334Q) の活性を調べることにより、3箇所のそれぞれの糖鎖が活性に重要であることが分かった。また、幾つかの糖鎖プロセッシングに対する阻害剤 (Tunicamycine, Castanospermine, Kifnesine) を用いた実験により、ST3Gal-V にはハイマンノース型糖鎖が活性に必須であることを明らかにした。しかしながら、糖鎖が酵素活性に重要であるにも関わらず、種間において SAT-I の糖鎖付加部位は保存されていない。そこで、我々は mSAT-I の種間変異体、H177D-N180S (killifish, tetradon 型)、N224K (human 型)、T336Q (zebrafish 型) を作成し、活性を測定した。その結果、これらの変異体は野生型と同等の活性を示した。つまり、我々は SAT-I において、糖鎖は酵素活性に必要であるが、糖鎖付加部位及びその近傍のアミノ酸を SAT-I の種間の配列をもとに置換することによって、その機能を代替えすることができる実証した。この進化情報をもとにしたアミノ酸代替置換法を SUNGA (Substitution of the N-glycan function in glycosyltransferases by specific amino acids) 法と命名し、大腸菌での活性型 SAT-I の大量調整を可能にし、立体構造解析への道を開いた (3)。

- (1) Tagami, S. et al., *J. Biol. Chem.* 277, 3085 (2002)
- (2) Kabayama, K., et al., *Glycobiology* 15, 21 (2005)
- (3) Uemura, S. et al. *Glycobiology* 16, 258 (2006)

### 3. 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、助教授）

②研究項目：

- 1) RNAi による SAT-I 遺伝子ノックダウン法を開発し、GM3 合成を抑制することによるインスリン抵抗性の解除法を開発する。
- 2) インスリン受容体 (IR) のインスリン抵抗性状態における動態を可視化するために 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、GM3 再構成細胞および脂肪細胞における IR と caveolin-1 の動態を FCCS や FRAP などの蛍光イメージング技術により検討する。
- 3) 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する。また、我々が開発した高感度 GSL 関連遺伝子検出システム (GSL アレイ) を用いて各組織の GSL 関連遺伝子の発現レベルを検討し、さらにヒト 2 型糖尿病患者における解析に発展的に繋げていく。

- 4) ヒト 2 型糖尿病における SAT-I 遺伝子をはじめとする GSL 関連遺伝子および GSL 組成の分析を目的として、現在交渉中のいくつかの医療施設および研究所から、厳密な生命倫理のもとにヒト脂肪組織入手し、ガングリオシドおよびその関連遺伝子の発現を解析する。
- 5) SAT-I ノックアウトマウスと肥満／インスリン抵抗性病態モデルマウスとの交配をおこないインスリン抵抗性発症との関連を追求する。また、SAT-I トランスジェニックマウスについても同様の検討を実施する。
- 6) 幹細胞からの脂肪細胞およびマクロファージ分化におけるマイクロドメインの関与とインスリン抵抗性病態の検討。
- 7) SAT-I の transcriptional variants の生理的・病態的意義の解析。
- 8) SAT-I の酵素活性発現における N-glycan の意義と酵素活性を維持した N-glycan アミノ酸代替え置換法の検討。

#### 「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メタボローム／プロテオーム解析

#### 「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、助教授）
- ②研究項目：インスリン受容体の可視化観察

#### 「構造生物学研究」グループ

- ①研究分担グループ長：稻垣 冬彦（北海道大学、教授）
- ②研究項目：GM3 合成酵素 (SAT-I) の構造生物学

#### 「ノックアウトマウス解析」グループ

- ①研究分担グループ長：藤原 道弘（福岡大学、教授）
- ②研究項目：インスリン抵抗性状態における脳の解析

## 4. 主な研究成果の発表

### (1) 論文（原著論文）発表

- Uemura, S., Kurose, T., Suzuki, T., Yoshida, S., Ito, M., Saito, M., Igarashi, Y., and Inokuchi, J. (2005) Substitution of the N-glycan Function in Glycosyltransferases by Specific Amino Acids (SUNGA): ST3Gal-V as a model enzyme. *Glycobiology* 16,258-270
- Tani-ichi, S., Maruyama, K., Kondo, N., Nagafuku, M., Kabayama, K., Inokuchi, J., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., Yagita, H., Kawano, S., and Kosugi, A. (2005) Structure and

function of lipid rafts in human activated T cells. *International Immunology* 17,749-758

- Sato, T., A.M. Zakaria, Uemura, S., Ishii, A., Ohno-Iwashita,Y., Igarashi, Y., and Inokuchi,  
L(2005)

Role for up-regulated ganglioside biosynthesis and association of Src family kinases with microdomains in retinoic acid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells.

*Glycobiology* 15,687-699