

「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・構造および機能に変化し、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。現在までに、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ている。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は細胞膜直上でインスリン受容体と相互作用し、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。

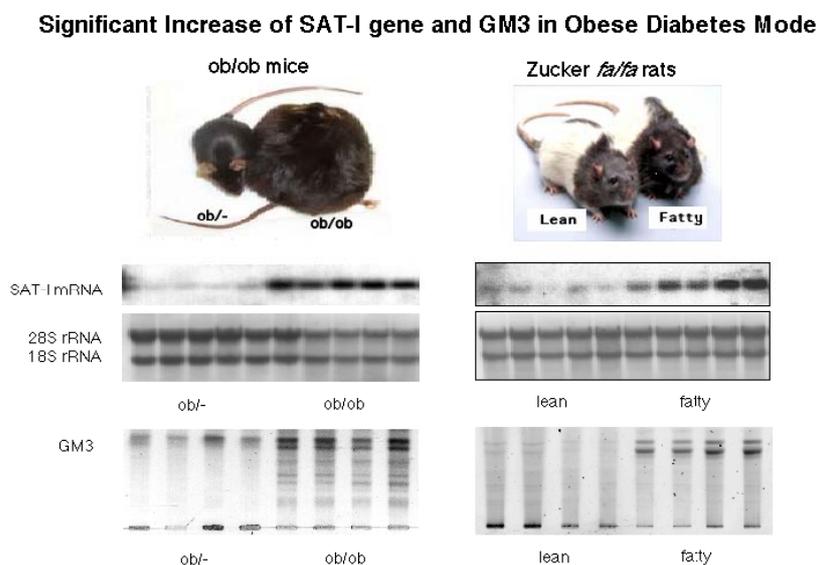
2. 研究実施内容

インスリン抵抗性惹起物質としてのガングリオシドGM3

TNF刺激による3T3-L1脂肪細胞のGM3の発現を経時的に検討したところ、TNF処理時間に依存したGM3含量の増加が認められ、このGM3の発現増加はSAT-I遺伝子の発現およびSAT-IのGM3合成酵素活性の上昇とよく相関した¹⁾。そこで、インスリン抵抗性の肥満病態モデル動物におけるGM3の発現を検討したところ、Zuckerラットおよびob/obマウスではleanに比べ著しいSAT-1遺伝子およびGM3の発現亢進が認められた(図1)。今後、ヒトの2型糖尿病の脂肪組織における検証が待たれる。TNF刺激3T3-L1脂肪細胞のインスリン抵抗性の獲得に伴って増加したGM3のインスリンシグナルへの影響を明らかにする為に、グルコシルセラミド合成酵素の特異的阻害剤D-PDMPを用いた検討を行った。D-PDMPによりTNF刺激で増加したGM3の発現が抑制されるとともにIRS-1のチロシンリン酸化の抑制がほぼ解除された

1)。この結果から、GM3の増加はIR-IRS-1シグナルを脱共役していることが示された。

図 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

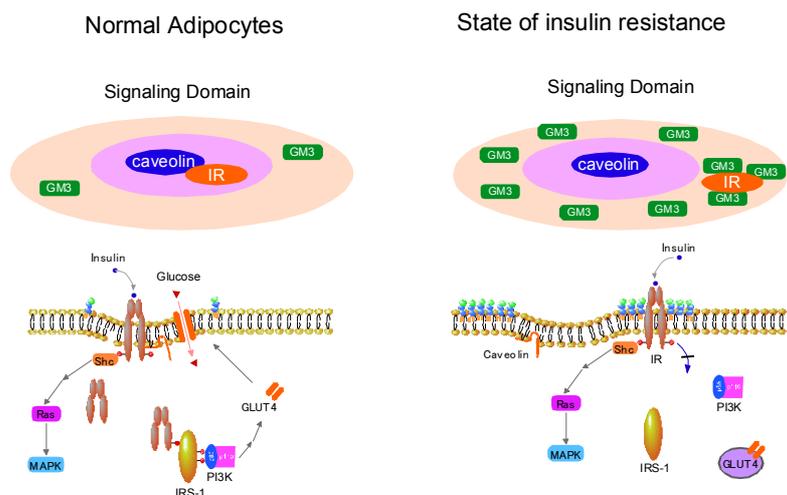
IRおよびIRSの細胞内動態の変化に注目して検討を行った。まず未刺激の3T3-L1脂肪細胞の細胞内器官を常法により遠心分画したところ、IRは細胞膜画分に局在し、IRS-1はエンドソーム画分には存在せず、細胞骨格タンパクを含むhigh speed pellet (HSP)画分に大部分が局在していた²⁾。そこで、インスリン刺激後のIRおよびIRS-1の細胞内動態をTNF α 処理、無処理細胞において検討したところ、TNF α 処理脂肪細胞ではインスリン刺激に伴うIRのエンドソーム画分へのインターナリゼーションおよびIRS-1のエンドソームへの集積が未処理脂肪細胞と比較して著しく抑制されていた²⁾。次に、TNF α の脂肪細胞のマイクロドメインへの影響を検討した。TNF処理脂肪細胞で増加したGM3は、界面活性剤不溶性の低比重マイクロドメイン画分に集積し、未処理細胞の約2倍に増加していた。一方、コレステロールの集積には変化は無かった。そこで、IRおよびマイクロドメインのマーカーであるカベオリン-1およびフローティリンの局在を調べたところ、TNF処理脂肪細胞では未処理の正常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²⁾。さらに、D-PDMPでTNFによるIR-IRS-1シグナルの抑制を解除した状態では、IRのマイクロドメインへの集積が回復し、IRのインターナリゼーションの抑制も部分的な回復を見せた²⁾。この事実は、2型糖尿病におけるインス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からの消失が、インスリンの代謝性シグナルの選択的抑制の原因であることを強く示唆している。

今後の展望

GM3がインスリン抵抗性の原因物質である理由として、1) TNF刺激脂肪細胞およびインスリン抵抗性モデル動物では、SAT-I遺伝子の発現上昇に伴うGM3の発現増加が認められる(図1)。2) インスリン抵抗性3T3-L1脂肪細胞ではIRはマイクロドメインに存在せず、

IRのインターナリゼーションが抑制されインスリンの代謝性シグナルが選択的に抑制される²⁾。3) TNF刺激脂肪細胞におけるGM3の増加を、D-PDMPによって阻止すると、インスリン刺激によるIRのインターナリゼーションとマイクロドメインへの集積が回復し、IR-IRS-1シグナルが正常化した^{1,2)}。これらの現在までの我々の研究結果を総合すると、マイクロドメイン機能異常とインスリン抵抗性の関係が図2のように浮かび上がってくる。今後、インスリン抵抗性病態におけるマイクロドメインの機能の変化を、現在実施中の生細胞における可視化マイクロドメイン分子(IR, caveolin-1, GM3)の相互作用解析 (FRAP, FRET, FCCS) によってインスリン抵抗性状態におけるマイクロドメイン機能異常を分子レベルで明らかにし、ガングリオシドGM3の病態生理学的意義の根本的解明を目指したい。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ことから (投稿中)、SAT-I立体構造解析の進展と特定SAT-I阻害剤の開発が期待される。

図 2



1) Tagami et al. J. Biol. Chem. **277**, 3085-3092, 2002

2) Kabayama et al. Glycobiology **15**, 21-29, 2005

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（北海道大学大学院薬学研究科 助教授）

② 研究項目：

- 1) SAT-I遺伝子導入アデノウイルスベクターの利用
- 2) RNAiによるSAT-I遺伝子ノックダウン法の開発と利用
- 3) インスリン受容体 (IR) GFP標識IRおよびRFP標識Caveolin-1プラスミドベクタ

- ーを利用し、生細胞におけるIR, Caveolin-1, GM3の相互作用を解析する。
- 4) 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。
 - 5) ヒト2型糖尿病の脂肪組織の収集
 - 6) SAT-I遺伝子トランスジェニックマウスの作成と利用
 - 7) SAT-I KOマウスのインスリンシグナルの検討と*db/db*マウス交配によるインスリン抵抗性発症との関連を追求する。
 - 8) 糖脂質生合成阻害剤によるインスリン抵抗性解除効果 (グルコース取り込み抑制の解除効果の有無) 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 フロンティア研究室)
- 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 (北海道大学電子科学研究所 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：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

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (原著論文) 発表

- Kabayama, K., Sato, T., Kitamura, F., Uemura, S., Kang, B. W., Igarashi, Y., Inokuchi, J. (2005)
TNF alpha-induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology* 15, 21-29
- Matsumoto, K., Sato, T., Oka, S., Inokuchi, J., Ariga, H. (2004)
Comparison of the Compositions of Phospholipid-Associated Fatty Acids in Wild-Type and Extracellular Matrix Tenascin-X-Deficient Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1447-1450
- Matsumoto, K., Sato, T., Oka, S., Orba, Y., Sawa, H., Kabayama, K., Inokuchi, J., and Ariga, H. (2004) Triglyceride accumulation and altered composition of triglyceride-associated fatty acids in the skin of

tenascin-X-deficient mice. *Genes to Cells*. **9**, 737-48

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：2件）