

「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

(東北薬科大学分子生体膜研究所機能病態分子学教室 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」

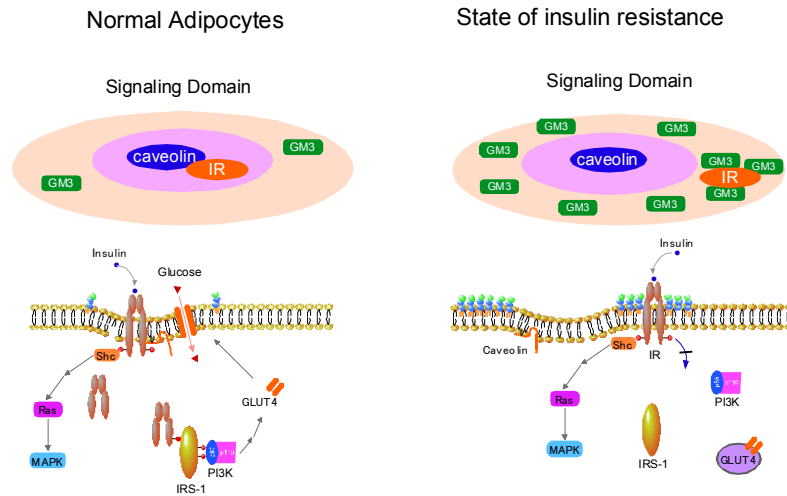
## 1. 研究実施の概要

2 型糖尿病などの生活慣習病の病態は、スフィンゴ糖脂質の異常発現によって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解明することを目的としている。インスリン受容体はガングリオシド GM3 の発現増加によって、カベオリン-1 との結合が弱められマイクロドメインから解離し、インスリン抵抗性状態を惹起する機構を証明した。さらに、2 型糖尿病患者の血清中 GM3 は有意に増加していることを見だし、メタボリックシンドロームの新たなリスクファクターとして GM3 の病態診断法の意義を検証中である。また、高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪組織で GM3 が増加していることをみいだしたことから、GM3 合成酵素遺伝子の活性化機構を解明し、実際のヒトの 2 型糖尿病、動脈硬化などのメタボリックシンドロームにおけるいかなる病態を反映しているかを明らかに出来ると期待している。

## 2. 研究実施内容

### GM3 発現増加によるインスリン抵抗性の発症機序の解明

肥満およびインスリン抵抗性を示す動物モデルの脂肪組織や TNF  $\alpha$  処理脂肪細胞ではガングリオシド GM3 が過剰発現することにより、インスリン受容体 (IR) のマイクロドメインへの局在が消失していることが強く示唆された。そこで、GM3 のカベオラマイクロドメインへの過剰集積によるマイクロドメインからの IR の解離機構の解明を試みた。現在までに、生細胞 (GM3 再構成細胞) を用いた蛍光標識 IR およびカベオリン-1 の生細胞イメージング (FRAP 法) によって、GM3 は IR とカベオリン-1 との結合を阻害することを証明した。また、免疫沈降法および放射標識 GM3 のアシル鎖をアジリジン修飾した光感受性 GM3 を用いた架橋実験の結果、GM3 と IR が直接相互作用する証拠を得、その機構として IR の  $\beta$  サブユニットの細胞膜直上のリジン残基と GM3 のシアル酸残基の静電的相互作用の重要性を示すことができた (論文投稿中)。従って、2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性発症におけるマイクロドメイン機能異常は、GM3 の発現上昇が IR とカベオリン-1 との結合を阻害し、インスリンシグナルが抑制される分子機構を証明することが出来た。



### メタボリックシンドロームにおけるガングリオシドの関与

メタボリックシンドローム(内臓脂肪症候群)は内臓脂肪の蓄積を基盤として、ひとりに複数の危険因子が集中し、動脈硬化性疾患(心筋梗塞や脳梗塞など)の危険性を高める複合型リスク症候群状態である。血清中の主要なガングリオシドであるGM3量をHPTLCにより定量したところ、糖尿病患者群は健常人群に比較して有意な高値を示した。

血清中のガングリオシドGM3量の増加は、高血糖のパラメーターとは相関せず、内臓脂肪症候群の病態を新たな角度から検出することが出来る新規なリスクファクターである可能性を検証中である。

そこで、ヒトの生活習慣のモデルとして高脂肪食の摂食をマウスに行うことによって、肥満と脂肪組織GM3量の関係を検討した。内臓脂肪組織のGM3量を解析したところ、高脂肪食グループでは通常食グループと比して2.9倍増加しており、肥満・高血糖と脂肪組織GM3量とは正の相関が認められた。また、高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪組織ではGM3合成酵素遺伝子発現も3倍増加していた。これらの結果より、メタボリックシンドローム(内臓脂肪症候群)における慢性炎症状態下におけるインスリン抵抗性発症等におけるGM3の病態生理学的意義が注目される。

### 生理的内臓脂肪細胞分化誘導法の確立

腸管から吸収された栄養成分は門脈やリンパ管を通過して肝臓へ運ばれ、全身組織に分配される。門脈、リンパ管が分布する腸間膜には年齢と共に脂肪組織が増殖するが、近年この腸間膜脂肪の過剰蓄積は、糖尿病、高脂血症、動脈硬化等の生活習慣病を引き起こすことが検証されてきている。したがって、内臓脂肪細胞の性質について知ることは、これらの生活習慣病の病態像を理解する上で重要な位置を占める。我々は世界に先駆けて、ラット腸間膜脂肪組織から調製した前駆脂肪細胞(visceral stromal cells : VSC)を成熟脂肪細胞(visceral adipocytes : VAC)にまで分化誘導する新規な培養法を確立した。本分化誘導系は、デキサメタゾンやイソブチルメチルキサンチンなどを必要とせず、天然物である脂肪酸、ビタミンおよびインスリンのみでVSCからVACへの分化が可能であり、人工分化誘導剤を含まない本分化誘導法が内臓脂肪細胞の生理機能の解明

に有用であることが判明した(論文投稿中)。

### GM3合成酵素のtranscriptional variantsの生理的・病態的意義の解析

GM3 増加が2型糖尿病の増悪に深く関与していることから、細胞内 GM3 量の調節機構の解明は重要な課題である。これまでに酵母における新規糖脂質合成酵素の同定に成功し(J. Biol. Chem. 2003)、その活性調節機構を明らかにし(J. Biol. Chem. in press)、現在はGM3 合成酵素(SAT-I)の活性調節機構の解明を試みている。

マウス SAT-I(mSAT-I)の5'-RASE 解析によって、エクソン1の異なるトランスクリプショナルバリエーションが少なくとも3種類(mSAT-Ia, mSAT-Ib, mSAT-Ic)存在し、N末端の細胞質領域の長さが異なる Long 型(63 aa)、Middle 型(36 aa)、Short 型(8 aa)が翻訳されることが判明した。SAT-Iには複数のN結合型糖鎖が付加されることから、Long 型、Middle 型、Short 型の糖鎖構造をレクチンブロットにより解析した。その結果、Middle 型及び Short 型がハイマンノース型以外に複合型糖鎖を持っているのに対し、Long 型はハイマンノース型糖鎖しか持っていなかった。この結果はMiddle 型と Short 型がゴルジ体へ運ばれるのに対して、Long 型は小胞体に留まることが明らかになった。シアル酸転移酵素の多くは比較的短い細胞質領域を持ち(5-20 aa)、ゴルジ体で機能している。ガングリオシド合成の最初のステップに関わるSAT-Iが小胞体局在化機構を持つという事は、細胞内ガングリオシド量を制御する上で重要な意味を有していると考えられる。

## 3. 研究実施体制

### (1)「マイクロドメイン分子病態研究」グループ

#### ①研究者名

井ノ口 仁一(東北薬科大学 教授)

#### ②研究項目

- ・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。特に、IR の  $\beta$  サブユニットの細胞膜直上のリジン残基と GM3 のシアル酸残基の静電的相互作用を検証し、GM3 と IR が直接相互作用する証拠を得る。
- ・ヒト 2 型糖尿病におけるガングリオシド発現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および血漿を入手し、ガングリオシドの発現を解析する。
- ・ラット内臓細胞初代培養系を用いて、インスリン抵抗性状態における GM3 とマイクロドメインの機能異常と肥大化脂肪組織におけるアディポネクチン分泌低下との関係を追求する。また、脂肪組織中の常在性マクロファージの活性化に伴う脂肪細胞の分化を抑制やインスリン抵抗性誘導と、マクロファージからの TNF 分泌による GM3 発現亢進の関連を検証する。
- ・SAT-I の transcriptional variants の生理的・病態的意義の解析。

- ・ SUNGA 法による SAT-I たんぱくの大量調整と検討
- ・ SAT-I KO マウスバッククロスおよび SAT-Iトランスジェニックマウスが完成しつつあることから、胎児繊維芽細胞および分離脂肪細胞におけるインスリンシグナルの変化を検討する。

(2)「メタボローム・プロテオーム研究」グループ

①研究者名

鈴木 實((独)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

(3)「1分子動態研究」グループ

①研究者名

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

(4)「構造生物学研究」グループ

①研究者名

稲垣 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

(5)「ノックアウトマウス解析」グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

### (1) 論文発表(原著論文)

- Uemura, S., Fei Feng, Kume, M., Yamada, K., Kabayama, K., Nishimura, S., Igarashi, Y., and Inokuchi, J. Cell Growth Arrest by Sialic Acid Clusters in Ganglioside GM3 Mimetic Polymers. *Glycobiology* **17**, 568-577 (2007).
- Uemura, S., Kihara, A., Iwaki, S., Inokuchi, J., Igarashi, Y., Regulation of the transport and protein levels of the inositol phosphorylceramide mannosyltransferases Csg1 and Csh1 by the Ca<sup>2+</sup>-binding protein Csg2. *J Biol Chem.* **282**,8613-8621 (2007).
- Inokuchi J., Insulin resistance as a membrane microdomain disorder. *Biol. Pharm.*

*Bull.***29**,1532-1537 (2006).

- J.S. Schneider, K.A. Bradbury, Yoshihiro Anada, Jin-ichi Inokuchi, D.W. Anderson, The synthetic ceramide analog L-PDMP partially protects striatal dopamine levels but does not promote dopamine neuron survival in murine models of parkinsonism. *BRAIN RESEARCH* **1099**, 199-205 (2006).
- Noguchi, M., Kabayama, K., Uemura, S., Kang BW, Saito, M., Igarashi, Y., Inokuchi, J., Endogenously Produced Ganglioside GM3 Endows Etoposide and Doxorubicin Resistance by Up-regulating Bcl-2 Expression in 3LL Lewis Lung Carcinoma Cells. *Glycobiology* **16**, 641-650 (2006).

## (2) 特許出願

平成 18年度特許出願: 1件 (CREST 研究期間累積件数: 2件)