

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 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

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者： 井ノ口 仁一（東北薬科大学分子生体膜研究所 教授）

主たる共同研究者：

鈴木 實((独)理化学研究所・フロンティア生体超分子研究グループ 研究員)(～平成 20 年 3 月)

金城 政孝(北海道大学電子科学研究所 教授)(～平成 19 年 3 月)

稲垣 冬彦(北海道大学大学院薬学研究科 教授)(～平成 20 年 3 月)

岩崎 克典(福岡大学薬学部 教授 )(平成18年4月～)

小宗 静男(九州大学大学院医学研究院 教授)(平成19年8月～)

3. 研究内容及び成果：

研究代表者である井ノ口の研究グループは、肥満に伴う脂肪細胞のインスリン抵抗性状態では、ガングリオシド GM3 の発現上昇が起こることをレプチン欠損肥満モデルマウスおよび TNF $\alpha$  処理培養脂肪細胞で認め、この GM3 発現上昇をスフィンゴ糖脂質合成阻害剤 D-PDMP で阻止することにより、インスリン抵抗性が解除されることをクレスト採択時の知見として、世界に先駆けて見いだしていた。そこで本研究では、「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」という新たな分子病態像の解明を目指した。

井ノ口グループは、インスリン抵抗性を獲得した TNF $\alpha$  処理脂肪細胞ではインスリン受容体(IR)のマイクロドメインへの局在が消失していることを見いだした。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 の解離機構の解明に挑戦した。正常な成熟脂肪細胞におけるインスリン代謝性シグナルは、カベオラに存在する IR から始まり、一連の経路を介して糖取り込みを行う。一方、インスリン抵抗性状態では、GM3 の増加によりマイクロドメインの構成および機能に異常が生じ、IR をカベオラから解離することで代謝性シグナルを抑制することを生細胞イメージングなどの手法(北海道大学 金城政孝教授らとの共同研究)を用いて明らかにした。本研究成果は、「新たな糖尿病メカニズムの解明」「新しい2型糖尿病の治療法へ道」として報道された。本研究成果をもとに、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3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。さらに興味あることに、高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪組織では GM3 合成酵素(SAT-I)遺伝子発現も3倍増加していた。そこで、高脂肪食を負荷した SAT-I 欠損マウスおよび野生型マウスにおける内臓脂肪組織の遺伝子発現およびプロテオーム解析(理化学研究所 鈴木実博士との共同研究)を実施した。SAT-I 欠損マウスでは正常マウスと比して内臓脂肪組織の炎症性サイトカインの遺伝子発現が低かったのに対して、抗炎症性サイトカインの発現は高かった。さらに、SAT-I 欠損マウスの方がアディポネクチンの発現が高く、一方、動脈硬化の進展に関与する PAI-1 や iNOS の発現は低かった。以上より、SAT-I 欠損マウスのインスリン感受性亢進の要因として、肥満による内臓脂肪組織の慢性炎症状態に対しては抵抗性を示し、全身のメタボリズムが維持されていると考えられる。さらに、ヒト血清を用いた検討により、肥満糖尿病患者で有意な血清 GM3 レベルの上昇が確認され、GM3 はメタボリックシンドロームの新たなバイオマーカーとしての可能性を見いだし

ている。

SAT-Iはゴルジ体においてGM3を合成するII型膜タンパク質である。井ノログループは、SAT-IはN末側の細胞質領域の長さが69 aa (M1)、42 aa (M2)、14 aa (M3)と異なる3種類のアイソフォームを産生し、M2-及びM3-SAT-Iはゴルジ体に局在するが、M1-SAT-Iは驚くべきことに小胞体に局在していることを見いだした。M1-SAT-Iの小胞体局在化機構を検討したところ、細胞質領域のアルギニン残基(RRXXXXR)からなるR-based motifが小胞体への逆行輸送シグナルとして機能していることを証明した。ガングリオシド生合成の最初の酵素であるSAT-Iが、細胞内局在や安定性の異なるアイソフォームを産生するシステムは、様々な環境変化やストレス状況下におけるGM3及びそれ以降のガングリオシドの安定供給に重要だと推測される。この発見が端緒となって、新たなガングリオシド生合成制御法の開発が期待される。本研究課題の波及効果としては、「膜マイクロドメイン機能異常と病態」すなわちマイクロドメイン病の発掘が期待される。SAT-I KOマウスの行動薬理的検討を福岡大学臨床疾患薬理学教室の岩崎克典教授のグループと検討したところ、聴覚障害というフェノタイプを示すことを見いだした。そこで、SAT-I KOマウスの聴覚障害の原因を聴覚の生理学的小および組織学的検討を九州大学耳鼻咽喉科教室の小宗静男教授のグループと実施した。SAT-I KOマウスでは、生後まもなく聴覚機能異常を発症し、その後成長するにつれ内耳蝸牛内の音を電気信号に変換する器官であるコルチ器の選択的脱落が観察された。本知見は、聴覚機能に複合糖質が深く関与していることを示す最初の例である。

SAT-Iの立体構造の解明に挑戦中である。我々の研究対象である糖転移酵素の多くが結晶化の妨げとなるアスパラギン結合型糖鎖を持つ糖タンパク質であり、その糖鎖が酵素活性に必須であることが挙げられる。しかしながら、シアル酸転移酵素のアスパラギン結合型糖鎖付加部位を、種間で比較するとその保存性は驚くほど低く、糖鎖が無い種の酵素では、そのアミノ酸配列が糖鎖機能を模倣している可能性が示唆された。そこで、北海道大学の稲垣冬彦教授との共同研究により、大腸菌発現システムで糖鎖機能を代替するSAT-I変異体が大腸菌で発現させた場合でも活性を持つことを証明した。現在、結晶化の最適条件について検討している。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本研究の目的は「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」との作業仮説を検証し、あらたな分子病態像の解明を目指した。研究代表者はこれらに関して数々の知見を得て「マイクロドメイン病」なる仮説を、説得力を持って語れるようになった。

その他、聴覚やT細胞におけるガングリオシドの機能解析を行い、独創性のある研究成果が出ている。

チーム全体の論文数は15件で、他チームに比べて多くないが、全て研究代表者の論文であり、研究代表者の成果は十分である。2007年のPNASの掲載時にはプレスリリースを行なった。

原著論文 11件    招待講演 29 件    口頭発表 20 件  
特許出願 国内 3件    海外 2件

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

独自のコンセプトにより研究を進め、この分野において世界レベルで認知される研究成果が出ている。2型糖尿病の治療に関して、マイクロドメインの構成因子を薬剤で制御する可能性が提唱されて来ている。その一つが、研究代表者がアメリカでポストドク時代に関与した糖脂質の合成阻害剤である。研究代表者の提唱し

ている2型糖尿病の発症機構についてはまだ仮説の域であるが、今後の研究進展により、糖尿病、肥満などの治療や予防に役立つことを期待したい。

GM3 合成遺伝子 (SAT-1) のノックアウトマウスが難聴であったことの発見は高く評価できる。ガングリオシドが聴覚機能形成において重要であることを示した初めての例であり、難聴の病態がまだ十分理解されておらず、有効な治療法がない現状で、今後の研究の発展が期待される。更に難聴の原因究明により、GM3 の重要な機能が見つかるかもしれない。そうすると、糖脂質の機能が具体的に明らかになる最初の例となる可能性がある。

SAT-1 のトランスクリプショナルバリエントによる細胞内局在の違いについては、十分なデータで証明できれば、メンブレントラフィックの研究分野でも画期的な成果となることが期待される。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

共同研究者の業績が少ないが、研究代表者のリーダーシップが非常に明確な研究体制であり、研究代表者の研究課題を中心に、必要な知識、技術導入を行い、積極的な研究を展開した結果であると判断される。

以上