

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790363

研究課題名(和文) 糖尿病抑制因子 GnT-IVa を標的とした新規糖尿病治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel antidiabetic drug based on the targeting of GnT-IVa glycosyltransferase

研究代表者

大坪 和明(OHTSUBO, KAZUAKI)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：30525457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓細胞がもつグルコースセンサー機能の維持に重要な役割を果たす糖転移酵素 GnT-IVa に着目し、その生理的な機能制御のメカニズムの解析を通じて新たな糖尿病治療薬開発の基盤研究を実施した。その結果、高脂肪食摂取により誘導される酸化ストレスが引き金となってGnT-IVaの発現を抑制し、細胞のグルコースセンサー機能を障害し、インスリン分泌が低下することが判明した。また、細胞でGnT-IVaを強制発現することで、細胞の機能や糖代謝の保持が可能であることが判明し、GnT-IVaおよび糖鎖が糖尿病治療の標的となる確証を得た。また、GnT-IVaの発現を誘導する化合物探索アッセイ系を確立した。

研究成果の概要(英文)：We have focused on the physiological and functional regulation mechanism of a glycosyltransferase "GnT-IVa", modulating the glucose sensor function of pancreatic beta cells, for developing a novel antidiabetic drug. We have revealed that high fat-diet induces significant oxidative stress in pancreatic beta cells that can be a trigger to suppress GnT-IVa expression and diminishes glucose stimulated insulin secretion in the pathogenesis of type 2 diabetes. Besides, we engineered to express GnT-IVa in pancreatic beta cells in vivo, and then revealed that they are resistant to the high fat-diet induced diabetes that strongly suggest that GnT-IVa is an important target to develop antidiabetic drugs. We established cell-based assay system for exploring the drug compounds enhancing GnT-IVa expression from chemical libraries.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：糖鎖修飾 グルコーストランスポーター グルコースセンサー機能 膵臓 細胞

1. 研究開始当初の背景

我国の糖尿病患者数は増加の一途をたどっており700万人に達する。しかし、これはほんの氷山の一角に過ぎず実際には境界型糖尿病患者を含めると2,000万人にも及ぶ。日本人の2型糖尿病はβ細胞からのインスリン分泌不足を主因とするため、患者の約7割がインスリン分泌を亢進させるSU薬(スルホウレニア剤)を服用しているが、低血糖やβ細胞の疲弊が大きな問題となっており新規糖尿病治療薬開発が望まれている。我々はGnT-IVaが有望な新規糖尿病治療標的候補であるという研究シーズを得ていた。膵臓β細胞に高発現する糖転移酵素N-acetylglucosaminyltransferase-IVa(GnT-IVa, 遺伝子名 *Mgat4a*)の欠損がインスリン分泌不全により糖尿病となることを発見し、そのメカニズムの詳細な解析からGnT-IVaが膵臓β細胞膜上のグルコーストランスポーター2(GLUT2)の糖鎖修飾を行うことで血糖が適切に認識され、インスリン分泌が誘導されることを明らかにした[Ohtsubo et al, Cell, 2005]。この発見は糖鎖による膜タンパク質の機能制御の1つのメカニズムを解明し、さらにその異常が疾病発症をもたらすことを明示した糖鎖研究におけるブレークスルーと評価された[Ohtsubo et al, Cell, 2006]。偶然にも同時期に発表された2型糖尿病患者の網羅的遺伝子発現解析により、2型糖尿病患者β細胞では健常者に比べ *Mgat4a* 遺伝子の発現レベルが約60%低下していた[Gunton et al, Cell, 2005]。加えて *Mgat4a* 遺伝子がヒトゲノムの2型糖尿病感受性領域に存在することも報告されていた[McCarthy, Curr.Diab.Rep, 2003; Van Tilburg et al, J Clin Endocrinol Metab, 2003]。過食・肥満を契機に発症する2型糖尿病は我国を含む先進国において生活習慣病として大きな問題となりつつあるが、以上の知見はGnT-IVaがヒト2型糖尿病の発症・進展に深く関与していることを示している。これは従来にない新しい糖尿病発症概念である。

2. 研究の目的

本研究では糖尿病抑制因子GnT-IVaを標的とした新規糖尿病治療薬開発を究極的な研究目的としており、その段階的な目標として(1)β細胞における多面的なGnT-IVa機能の詳細解析
膵臓細胞におけるGnT-IVa発現制御メカニズムの詳細の解明と糖尿病発症過程におけるGnT-IVa発現低下のしくみの解析。さらに膵臓細胞膜上でのGnT-IVa依存的糖鎖修飾によるGLUT2の機能制御メカニズムの解析を行う。

(2)β細胞機能保持による末梢組織への作用の解析

糖尿病発症初期過程において、膵臓細胞ではGnT-IVaの発現が低下し、GLUT2の局在異常を起因とするグルコースセンサー機能の

障害が生じる。そこで、GnT-IVa糖転移酵素を膵臓細胞で発現維持することで、高脂肪食負荷による糖尿病発症抑制効果を解析する。これにより、細胞機能保持が末梢組織へ及ぼす影響を明らかにする。

(3) *Mgat4a* 発現誘導化合物探索のための実験系の確立

GnT-IVaの発現誘導を作用点とする新規糖尿病治療薬の開発には、細胞レベルで作用する *Mgat4a* の発現を惹起する化合物を探索することが必要である。ここでは、インスリンノーマ細胞株を用いて化合物スクリーニングを行う実験系を確立する。

といった包括的検討を行い研究開発基盤の確立をめざす。

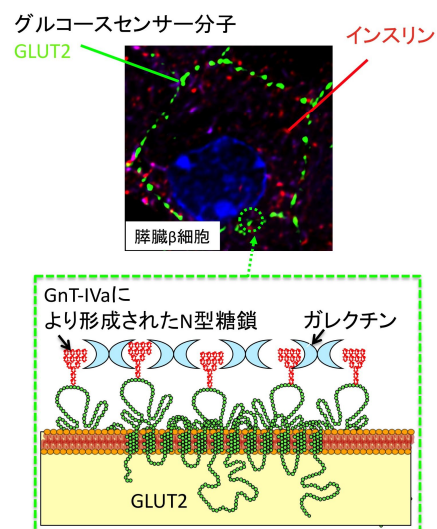
3. 研究の方法

(1)β細胞における多面的なGnT-IVa機能の詳細解析

Mgat4a 遺伝子の発現制御を解析するために、遺伝子プロモーター領域のモチーフ解析を行った。さらに、転写因子のノックダウン細胞での *Mgat4a* 遺伝子の発現レベルの変化の解析やクロマチン免疫沈降法によるプロモーター領域への転写因子の結合を解析した。標準食・高脂肪食を摂取したマウス膵臓細胞での解析結果をもとに、in vitroでの再構成実験を行うことで、発現抑制因子の探索を行った。また、細胞内の転写因子の局在を蛍光免疫染色法により解析した。

我々はこれまでにGnT-IVaが形成するN型糖鎖分岐鎖が細胞表面でのガレクチンとの結合を可能とし、細胞表面でのGLUT2の安定的発現を制御している(図1)。

図1糖鎖によるGLUT2の安定化とグルコースセンサー機能維持



そこで、GnT-IVa依存的糖鎖修飾による、膵臓細胞膜におけるGLUT2タンパク質の膜ドメイン局在およびグルコース輸送活性の制御メカニズムの解析を行うため、野生型およびGnT-IVa欠損マウスより単離した細胞を用いて、GLUT2の膜マイクロドメイン局在

を密度勾配遠心による分離・解析を行った。さらに、単離した細胞を methyl- β -cyclodextrin 処理による lipid raft の破壊や、GLUT2 が持つ N 型糖鎖構造と類似の Lactose を処理することで GLUT2 の N 型糖鎖とガレクチンとの結合を競合阻害し、その後 GLUT2 の膜マイクロドメイン局在解析を同法により実施した。

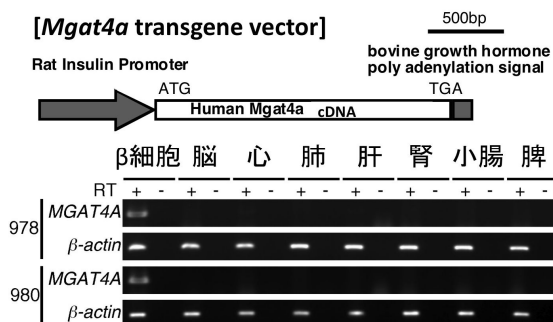
ヒト 2 型糖尿病患者膵臓 細胞の解析

で得られた知見をヒトの 2 型糖尿病患者ドナーより提供頂いた膵臓 細胞を用いて検証し、実際のヒトの 2 型糖尿病の発症メカニズムに寄与しているかどうかを解析した。

(2) β 細胞機能保持による末梢組織への作用の解析

個体レベルで、細胞のグルコースセンサー機能保持による末梢組織でのグルコース代謝の影響を解析するため、膵臓 β 細胞特異的に GnT-IVa を発現するトランスジェニックマウスを作成した。トランスジーンベクターは rat insulin promoter (RIP) 2 の下流にヒト MGAT4A 遺伝子およびウシ成長因子ポリ A シグナルを連結したものを構築し、Blastocysto への microinjection により導入し作成した (図 2)。

図2 GnT-IVaトランスジェニックマウスの作成



この作成したトランスジェニックマウスマウスに対して、高脂肪食負荷を行い、血清生化学解析、糖負荷試験、インスリン負荷試験、clamp test によるグルコース代謝解析 (米国、カリフォルニア大学サンディエゴ校 Jerrold Olefsky 博士、Mark Chen 博士、カリフォルニア大学サンタバーバラ校 Jamey Marth 博士との共同研究) を実施した。また、膵臓 細胞における GLUT2 の糖鎖修飾、発現・局在、グルコース輸送活性の解析や、単離 細胞における in vitro insulin secretion assay を実施した。また、インスリン刺激による筋肉、白色脂肪組織における Akt-1 および、IRS-1 のリン酸化の解析を行い、末梢組織におけるインスリンシグナルの解析を行った。

(3) *Mgta4a* 発現誘導化合物探索のための実験系の確立

ヒト MGAT4A 遺伝子プロモーター領域 (2715bp 5' non coding region) を PCR 法によ

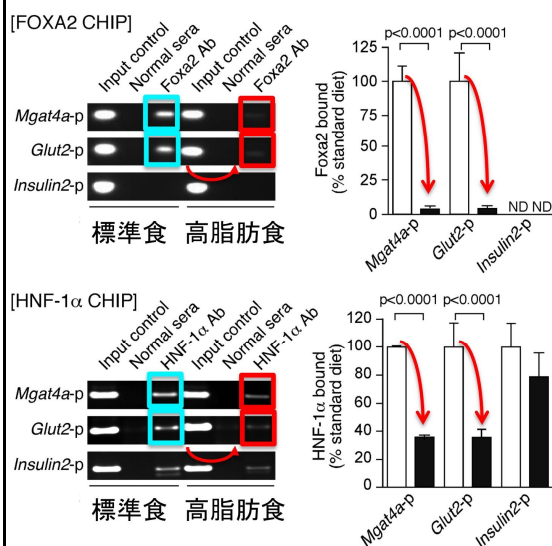
り増幅し、末端に NheI および XhoI サイトを導入した。これを pGL4.16 ルシフェラーゼレポータープラスミドに組み込んだ。作成したプラスミドは Min6 細胞 (マウスインスリン β 細胞) に導入し、安定発現細胞株を樹立した。パイロットテストとして、この細胞を用いて異なるグルコース濃度、遊離脂肪酸濃度環境下で培養を行い、細胞レベルでのレポーターの動作チェックを行った。

4 . 研究成果

(1) β 細胞における多面的な GnT-IVa 機能の詳細解析

ヒト及びマウスの *Mgat4a* 遺伝子のプロモーター領域の転写因子結合モチーフを TFBIND (tfbind.hgc.jp) により解析した。両プロモーターの塩基配列に有意な相同性は見られていなかったが、ともに細胞の発生や機能維持に不可欠な転写因子 FOXA2 および HNF-1 のシスエレメントが存在していることが判明した。また、同時に GnT-IVa と発現分布が一致している GLUT2 のプロモーター領域のモチーフ解析を行ったところ、こちらもヒト及びマウスにおいて FOXA2 および HNF-1 のシスエレメントが存在していることが示された。これら結果は、特定の細胞種において *Mgat4a* 遺伝子と GLUT2 遺伝子が FOXA2 および HNF-1 によって転写制御を受けていることを示唆していた。そこで、マウスより単離した膵臓 細胞に FOXA2 および HNF-1 に対する siRNA を導入し、*Mgat4a* および GLUT2 の発現レベルの解析を行った。その結果、FOXA2 および HNF-1 の抑制によりこれら遺伝子の発現が低下し、両遺伝子の発現が FOXA2 および HNF-1 により制御されていることが明らかになった。この結果を踏まえて、*Mgat4a* 遺伝子及び GLUT2 遺伝子のプロモーター領域への FOXA2 および HNF-1 の結合を、高脂肪食負荷マウス 細

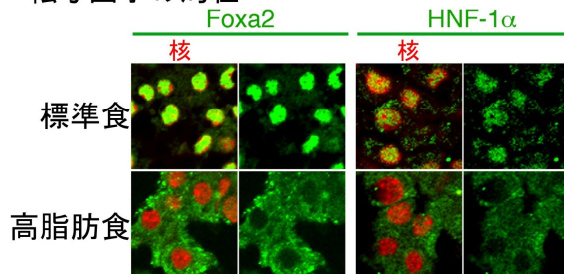
図3 *Mgat4a*, *Glut2*プロモーターへのFOXA2, HNF-1 α の結合



胞においてクロマチン免疫沈降法により解

析した。その結果、高脂肪食負荷マウス 細胞ではこれら転写因子の結合が著しく低下していることが判明した(図3)。さらにこの結合低下のメカニズムを解析した結果、高脂肪食負荷によりこれら転写因子が核外に放出されることが判明した(図4)。

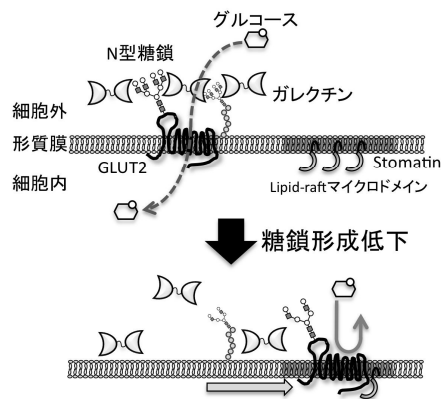
図4 高脂肪食負荷マウスβ細胞における転写因子の局在



さらに、高脂肪食摂取によるどのような生理的变化が転写因子の核外排出を惹起するかを単離細胞の培養系を用いて解析した結果、遊離脂肪酸処理により生じる酸化ストレスが核外排出を引き起こすことが判明した。以上の結果は、高脂肪食摂取により引き起こされる高遊離脂肪酸血症が細胞に高度な酸化ストレスを惹起し、転写因子の核外排出を介して GnT-IVa の発現抑制、ひいてはグルコースセンサー機能障害をおこすことを意味している。

糖鎖修飾による膵臓細胞表面における GLUT2 の膜マイクロドメイン局在の制御を解析するため、野生型マウス、および GnT-IVa 欠損マウスより単離した膵臓細胞の膜画分をショ糖密度勾配遠心により分画した。その結果、通常 GLUT2 は non lipid-raft に存在するが、欠損マウスでは lipid-raft に移行していることが明らかとなった。さらに、単離細胞培養上清に、Lactose を添加し、GLUT2 の N 型糖鎖とガレクチンとの結合を競合的に阻害すると、同様に GLUT2 が lipid-raft へと移行することが判明した。この GLUT2 の移行と一致して GLUT2 の糖輸送活性が低下することが見出された。この輸送活性低下は methyl-β-cyclodextrin 処理により lipid-raft を破壊すると生じないことから、lipid-raft への GLUT2 の移行が深く関与していることが示された。そこで、GLUT2 と結合する lipid-raft タンパク質を探索した結果、Stomatin が結合することを見出した。Stomatin は GLUT2 の類似タンパク質である GLUT1 の C 末細胞質ドメインに結合することで糖輸送活性を阻害することが知られており、相同性が高い GLUT2 の糖輸送活性を阻害したと考えられた。これらの事実は、GnT-IVa による GLUT2 の糖鎖修飾が細胞膜マイクロドメイン局在を制御することで、グルコース輸送活性を調節することで、グルコース刺激によるインスリン分泌応答を動的に制御していることを意味している(図5)。

図5 糖鎖によるGLUT2の膜マイクロドメイン局在とグルコース輸送活性制御

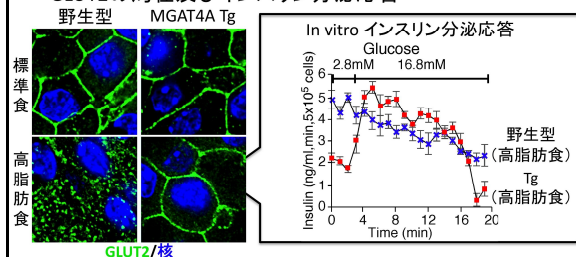


ヒト2型糖尿病患者膵臓細胞の解析で得られた結果が、ヒトの2型糖尿病の発症過程にも関与するのかを検証するため、米国 ICR(islet cell resource center)にドナー登録していた2型糖尿病患者および健常者ドナーより摘出・単離した膵臓細胞において同様の解析を実施した。その結果、2型糖尿病患者細胞においても FOXA2 および HNF-1 の核外排出が観察され、GnT-IVa の発現低下、GLUT2 の糖鎖修飾不全、グルコース取り込み機能の低下、グルコース刺激によるインスリン分泌応答の減弱が観察された。この事実は、糖鎖修飾不全がヒトの2型糖尿病の発症過程に深く関与していることを意味しており、糖尿病の病態解明において非常に重要な知見である。

(2) β細胞機能保持による末梢組織への作用の解析

作成した MGAT4A トランスジェニック(Tg)マウスに高脂肪食負荷実験を行った結果、通常 GnT-IVa 発現障害に起因する糖鎖形成不全により GLUT2 が細胞内に貯留するが、Tg マウスでは、糖鎖修飾が維持され細胞表面での発現が保持されていた。この結果と一致して、これらマウスより単離した細胞では、本来失われてしまうグルコース刺激によるインスリン分泌応答が保持されていることが判明した(図6)。

図6 MGAT4Aトランスジェニックマウス膵臓β細胞内の GLUT2の局在及びインスリン分泌応答



この結果を反映して、Tg マウスでは血糖値が長期間正常域に保持されていた。同時に実施したグルコース負荷試験においても、耐糖能が正常に保たれていることが示された。一方、インスリン負荷試験においては、末梢組織に

おけるインスリン感受性が高く保持されていることも判明した。また、筋肉や白色脂肪組織におけるインスリンシグナルを Akt-1 および IRS-1 のリン酸化により解析した結果、Tg マウス組織でインスリンシグナルの伝達が野生型マウスに比べ良好に保持されていることが判明した。これら糖代謝プロファイルは、Euglycemic および Hyperinsulinemic Clamp test において確認された。これら結果は膵臓細胞で G_nT-IVa を高発現することで細胞の機能が保持されるだけでなく、末梢組織のインスリン感受性も正常に維持することができ、糖尿病発症を抑制することができることが示された。この結果は、糖鎖及び糖転移酵素が新規の糖尿病治療薬の候補となることを強く示唆している。

(3) *Mgat4a* 発現誘導化合物探索のための実験系の確立

マウスインスリン α 細胞株 Min6 をもとに作成したレポーター細胞を用いて、様々な培養条件での、ルシフェラーゼ活性を測定することでレポーター遺伝子の応答の確認を行った。その結果、*Mgat4a* プロモーターは細胞の増殖に応じて活性化するとともに、グルコース代謝の活性に一致して活性化することが示された。これら結果は、上述の転写制御の結果と非常によく一致するものである。また、これらアッセイは 96 well plate フォーマットで実施することが可能であり、今後の化合物ライブラリーを用いたハイスループット解析を可能とするものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 1 件)

Kazuaki Ohtsubo, Shinji Takamatsu, Congxiao Gao, Hiroaki Korekane, Tsutomu M. Kurosawa, Naoyuki Taniguchi. N-glycosylation modulates the membrane sub-domain distribution and activity of glucose transporter 2 in pancreatic beta cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 434 (2), 2013, pp346-351.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.076>

Rina Takamiya, Kazuaki Ohtsubo, Shinji Takamatsu, Naoyuki Taniguchi and Takashi Angata. The interaction between Siglec-15 and tumor-associated sialyl-Tn antigen enhances TGF- β secretion from monocytes/macrophages through the DAP-12-Syk pathway. *Glycobiology*, 査読有, 23 (2), 2012, 178-187.
doi: 10.1093/glycob/cws139

Kazuaki Ohtsubo, Mark Z Chen, Jerrold M

Olefsky, Jamey D Marth. A Pathway to Diet- and Obesity-Associated Diabetes Through Attenuation of Pancreatic Beta Cell Glycosylation and Glucose Transport. *Nature Medicine*, 査読有, 17, 2011, 1067-1075.
doi: 10.1038/nm.2414

[学会発表](計 1 1 件)

大坪和明、糖尿病発症過程における β 細胞の糖鎖異常、Japan Consortium for Glycobiology and Glycotechnology、仙台(東北薬科大学)2013年10月25日

大坪和明、高松真二、高叢笑、是金宏昭、谷口直之、膵臓 β 細胞における N 型糖鎖修飾による GLUT2 の膜ドメイン局在と機能制御、日本糖質学会年会、大阪(大阪国際交流センター)2013年8月7日

Kazuaki Ohtsubo, Mark Z. Chen, Jerrold M. Olefsky and Jamey D. Marth. Pathway to Diet- and Obesity-Associated Diabetes Through Attenuation of Pancreatic Beta Cell Glycosylation and Glucose Transport. Annual Meeting of Society for Glycobiology, Seattle USA, 2011, Nov. 11.

[図書](計 1 1 件)

Naoyuki Taniguchi, Tadashi Suzuki, Kazuaki Ohtsubo, Springer, Sugar Chains, 2014, 250.

[その他]

理化学研究所プレスリリース

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2011/110815/detail.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大坪 和明 (OHTSUBO, Kazuaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：30525457

(3)連携研究者

是金 宏昭 (KOREKANE, Hiroaki)

独立行政法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・研究員
研究者番号：50421912

中嶋 和紀 (NAKAJIMA, Kazuki)

独立行政法人理化学研究所・神経膜機能研究チーム・研究員
研究者番号：10442998