

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：32636

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11138

研究課題名(和文)糖鎖に着目した肥満予防・改善策の探索～肥満により変化する糖鎖の解析～

研究課題名(英文)Prevention Strategy of Obesity Focused on Glycans

研究代表者

蕪木 智子 (Kaburagi, Tomoko)

大東文化大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：40339479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肥満で起こる脂肪細胞の機能異常に、特定のタンパクにおけるシアル酸量低下が関与していることを見出した。シアル酸は、細胞のアンテナとなる糖鎖の端にある糖として、免疫をコントロールする一方、ガンや疾病の発症等にも関与することが知られる成分である。シアル酸の経口投与は、肥満マウスの体重、内臓脂肪量、血総コレステロール等を有意に抑制したが、これら効果は、シアル酸の有する抗酸化能を介した可能性が高いことが示された。今後、肥満に関連する糖尿病、動脈硬化などの疾患の治療を考える上で、生体および天然食品に含まれ安全性の高い成分としてシアル酸を標的にした新たな治療法の開発が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満では、脂肪細胞の機能変化が糖尿病や高血圧などの疾患を引き起こす因子となることが知られている。本研究では、糖鎖成分であるシアル酸の低下が、脂肪細胞の機能変化と関与することが発見され、さらにシアル酸の経口摂取が、肥満の抑制効果を有することも確認された。シアル酸は、生体成分であるとともに、母乳や様々な食品に含まれる安全性が高い成分である。よって、シアル酸を活用した肥満予防や肥満関連疾患の新たな予防・治療法の開発に貢献すると考えている。

研究成果の概要(英文)：The sialic acid (SA) is present at the end of glycan chains on the cell membrane surface and is an essential factor in bioregulation. We found that a decrease in the level of sialylated protein is associated with a dysfunction of adipocytes caused by obesity. The SA intake attenuated obesity with inhibiting hepatic oxidative stress and adipocytes' adipogenesis and serum lipid in high-fat diet induced obese mice. Since the SA is an essential component that exists in the human body and is also an ingredient in natural foods, it may be used to develop strategies to prevent and improve obesity without the risk of side effects.

研究分野：栄養生理学、栄養学、肥満

キーワード：肥満 糖鎖 シアル酸 N-アセチルノイラミン酸 肥満モデルマウス

### 1. 研究開始当初の背景

肥満により脂肪細胞は機能変化を起こし、糖尿病、高血圧、動脈硬化など様々な生活習慣病の発症を誘発することが知られている<sup>1-3)</sup>。一方で、脂肪細胞の機能変化における詳細なメカニズムはいまだ不明な点が多い。

糖鎖は様々な細胞において機能調節の役割を持ち、糖代謝や糖尿病、ガン、認知症など幅広い疾患発症に関与することが知られている。肥満に伴い、膵臓や脳において糖鎖が変化することが報告されているが<sup>4-6)</sup>、脂肪細胞では肥満による糖鎖の変化や役割は明らかでない。

### 2. 研究の目的

本研究では、脂肪細胞機能における糖鎖の役割解明に加え、肥満による脂肪細胞の機能変化に、糖鎖が調節的役割を担っているのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脂肪組織で肥満により変化する糖転移酵素および糖鎖の解析

##### ① 肥満により変化する糖転移酵素の網羅的解析

肥満モデルマウスの内臓脂肪として精巣上体周囲脂肪組織 (Epididymal adipose tissue: EAT) における糖転移酵素の遺伝子発現量の網羅的解析により、肥満で変化する糖転移酵素とそれにより変化する糖鎖構造の解析を行った。

##### ② 肥満により変化する糖タンパクの特定と脂肪細胞機能への影響

マウスの EAT を用いて、肥満により変化する糖鎖構造を有する糖タンパク質を質量分析により特定した。また特定した糖タンパク質の脂肪細胞における役割を解析した。

#### (2) 糖鎖の構成成分の摂取による肥満抑制効果の検討 (肥満モデルマウスを用いたシアル酸の経口投与実験)

マウスを高脂肪食にて肥満を誘導すると同時に、糖鎖成分シアル酸 N-acetylneuramic acid (NANA) を経口投与し、脂肪細胞への影響を、代謝関連因子、酸化ストレス関連因子の遺伝子発現量について rt-PCR を用いて解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 肥満による脂肪組織の解析

##### ① 脂肪組織において肥満により変化する転移酵素 *St6gal1* の発見

マウスの EAT においていくつかの高発現する糖転移酵素遺伝子を検出した (図 1 は上位 10 個表示)。その中から、肥満により EAT で最も減少する糖転移酵素遺伝子として、*St6gal1* (糖鎖末端にシアル酸を付加する酵素) が確認された (表 1)。肥満により EAT で低下する *St6gal1* 遺伝子は、 $\alpha$ 2,6 シアル酸の付加に関与する遺伝子である。EAT 抽出タンパク質を用いた SSA レクチン染色から、肥満 EAT における  $\alpha$ 2,6 シアル酸付加タンパクの減少を確認した (図 2A)。さらに、EAT 組織の SSA レクチン染色から、 $\alpha$ 2,6 シアル酸が脂肪細胞膜部分に確認され、肥満により低下することが組織学的にも確認された (図 2B)。

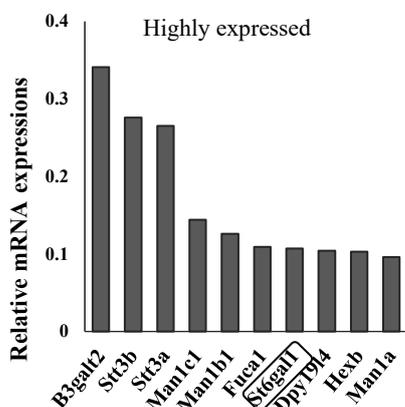


図 1. マウス EAT における糖転移酵素遺伝子 (発現量上位 10 個を表示)

表 1. 肥満により EAT でダウンレギュレーションされた糖転移酵素 TOP10

|                   | CON<br>(n=2) | HFD<br>(n=2) | Fold change<br>(log <sub>2</sub> ) |
|-------------------|--------------|--------------|------------------------------------|
| <i>St6gal1</i>    | 0.107        | 0.004        | -4.74                              |
| <i>St6galnac2</i> | 0.051        | 0.005        | -3.35                              |
| <i>Man1c1</i>     | 0.144        | 0.016        | -3.17                              |
| <i>B4gal4</i>     | 0.038        | 0.004        | -3.25                              |
| <i>Man1b1</i>     | 0.126        | 0.021        | -2.58                              |
| <i>Galnt18</i>    | 0.043        | 0.008        | -2.43                              |
| <i>Neu2</i>       | 0.067        | 0.018        | -1.90                              |
| <i>Man1a2</i>     | 0.042        | 0.013        | -1.69                              |
| <i>Dpy19l4</i>    | 0.104        | 0.032        | -1.70                              |
| <i>Galnt11</i>    | 0.039        | 0.012        | -1.70                              |

CON: 普通食マウス、HFD: 高脂肪食誘導肥満マウス

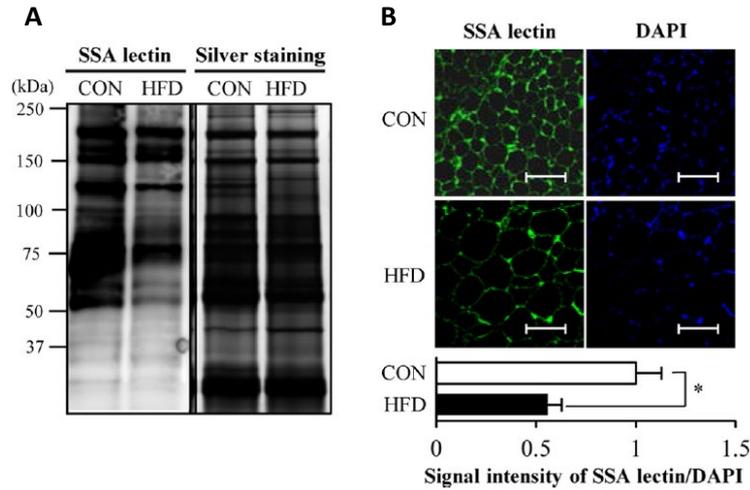


図2. マウス EAT のシアル酸付加タンパクの検出。A.  $\alpha 2, 6$ -シアル化タンパク質を SSA レクチン染色により検出。B.  $\alpha 2, 6$ -シアル化タンパク質の組織学的検出 (SSA レクチンを用いた蛍光染色)。CON : 普通食マウス、HFD : 高脂肪食誘導肥満マウス。

② 肥満により低下する  $\alpha 2, 6$  シアル化タンパク質として Integrin- $\beta 1$  を同定

マウス EAT から SSA レクチンにより  $\alpha 2, 6$ -シアル化タンパク質を抽出し、肥満マウスで減少したタンパク質 (120~130 kDa) の質量分析よりいくつかのタンパク質が同定された。その中から、細胞接着分子として脂肪細胞の分化・肥大に関わる Integrin- $\beta 1$  について、タンパク質レベルでも肥満によりシアル化が低下することが確認された (図 3A)。Integrin- $\beta 1$  の上流因子である FAK においても、肥満により活性低下 (リン酸低下) が示された (図 3B)。

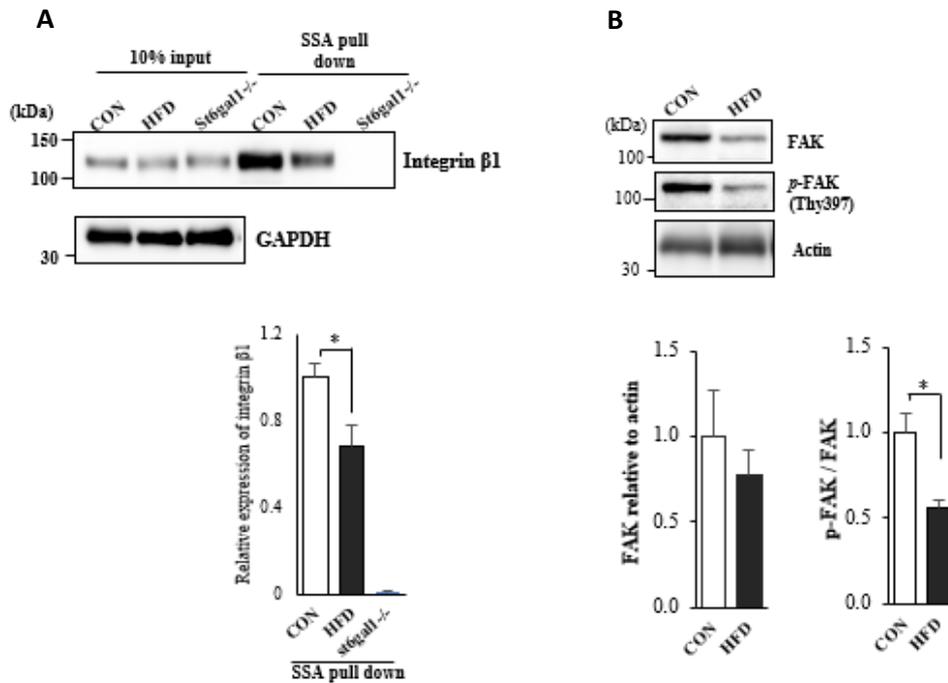


図3. マウス EAT の解析結果 A.  $\alpha 2, 6$ -シアル化 Integrin- $\beta 1$  の検出、B. FAK およびリン酸化 FAK の検出。CON : 普通食マウス、HFD : 高脂肪食誘導肥満マウス、St6gal1<sup>-/-</sup> : St6gal1 ノックアウトマウス。

(2) 外因的なシアル酸増加（経口的摂取）による肥満抑制効果

生体のシアル酸として主要成分である N-アセチルノイラミン酸 (NA) は、糖鎖の末端に存在し、食品成分として経口摂取した場合、抗酸化作用、免疫調節作用など機能性を有することが知られている<sup>7)</sup>。一方で、NA 経口投与による肥満抑制効果については不明であった。研究 1 により、肥満による Integrin- $\beta$ 1 のシアリル化低下が脂肪細胞機能変化に関与することが明らかとなったことから、NA の経口摂取（外因的増加）によるシアリル化タンパク変化により、肥満抑制効果が得られるのではないかという考えのもと、本研究を実施した。マウスに NA を 2 か月間連続投与した結果、HFD による体重増加（図 4）と EAT 肥大を抑制した（図 5）。

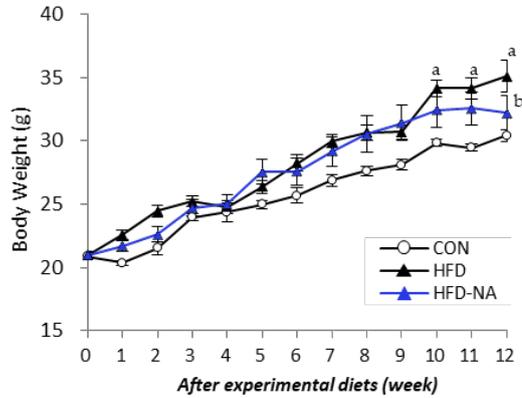


図 4. NA 投与による体重変化への影響。CON：普通食マウス、HFD：高脂肪食誘導肥満マウス、HFD-NA：1%NA 添加 HFD 投与マウス。

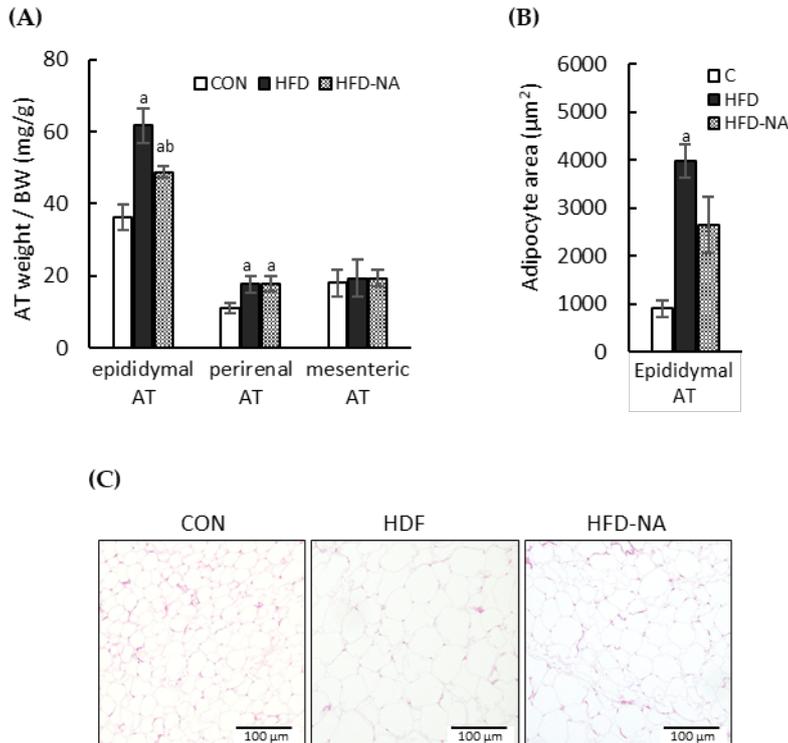


図 5. マウス内臓脂肪重量と組織学的観察。(A) EAT 重量、(B) EAT 脂肪細胞面積 (C) EAT の HE 染色画像。a :  $p < 0.05$  vs CON、b :  $p < 0.05$  vs HFD (Scheffe の多重比較検定)。CON：普通食マウス、HFD：高脂肪食誘導肥満マウス、HFD-NA：1%NA 添加 HFD 投与マウス、Epididymal AT：精巣上部周囲脂肪組織、perirenal AT：腎周囲脂肪組織、mesenteric AT：腸間膜脂肪組織。

さらに、NA 投与は、EAT の *Adipoq* および *Sod1* 遺伝子の HFD による低下を有意に抑制し、*Fabp4* を減弱させた。肝臓においても、精巢上体 AT 同様、*Sod1* 遺伝子の HFD による低下を有意に抑制した。血清生化学検査値においては、血清脂質およびトリグリセリドレベル、および肝脂肪滴が、NA 投与により減少した。一方で、NA 投与は、EAT の *St6gal1* 遺伝子の発現およびシアリル化タンパク質量には影響しなかった。結論として、NA の摂取は、シアリル化タンパクを介さず、HFD によって誘発される脂肪生成を阻害し、肥満予防および改善策への開発に貢献する可能性が考えられた。

## 結論

本研究により、肥満による脂肪細胞機能変化に糖転移酵素 *St6gal1* を介した、Integrin- $\beta$ 1 のシアリル化減少が関与することが示された。実際にヒトの遺伝子解析でも、ST6GAL1 が肥満や糖尿病と関係があることが、近年報告されている。今後、肥満に関連する糖尿病、動脈硬化などの疾患の治療を考える上で、 $\alpha$ 2,6 シアル酸を標的にした新たな治療法の開発が期待される。

シアル酸の経口投与においては、肥満抑制効果は認められたが、Integrin- $\beta$ 1 など糖タンパクの  $\alpha$ 2,6 シアリル化変化とは別の機序を介した効果である可能性が高い。今後、シアル酸経口投与による詳細な機序については、さらなる解析が必要である。

## <引用文献>

- ① Rosen, E. D., and Spiegelman, B. M. (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-853
- ② Matsuzawa, Y., Funahashi, T., and Nakamura, T. (1999) Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 892, 146-154
- ③ Moremen, K. W., Tiemeyer, M., and Nairn, A. V. (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 448-462
- ④ Ohtsubo, K., and Marth, J. D. (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126, 855-867
- ⑤ Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T. (2014) *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, Springer
- ⑥ Varki, A. C. R., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., and Etzler, M. E. (2009) *Essentials of Glycobiology*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, New York
- ⑦ hang Y., Mustapha U. I., Maznah I. et al. (2015) High fat diet-induced inflammation and oxidative stress are attenuated by N-acetylneuraminic acid in rats. *J Biomed Sci*, 22, 96.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Kanaki Kazuma, Otsuka Yuko, Hino Rumi, Kaburagi Tomoko  | 4. 巻<br>70            |
| 2. 論文標題<br>Low-carbohydrate diets adversely impact the skin of a mouse model of photoaging exposed to ultraviolet B radiation | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition  | 6. 最初と最後の頁<br>14 ~ 20 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3164/jcbn.21-18   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Kaburagi Tomoko, Kanaki Kazuma, Otsuka Yuko, Hino Rumi  | 4. 巻<br>11                |
| 2. 論文標題<br>Low-Carbohydrate Diet Inhibits Different Advanced Glycation End Products in Kidney Depending on Lipid Composition but Causes Adverse Morphological Changes in a Non-Obese Model Mice | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Nutrients   | 6. 最初と最後の頁<br>2801 ~ 2801 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/nu11112801   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Kaburagi Tomoko, Kizuka Yasuhiko, Kitazume Shinobu, Taniguchi Naoyuki | 4. 巻<br>292               |
| 2. 論文標題<br>The Inhibitory Role of 2,6-Sialylation in Adipogenesis               | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry                                       | 6. 最初と最後の頁<br>2278 ~ 2286 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1074/jbc.M116.747667                              | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>蕪木智子、木塚康彦、川口しのぶ、谷口直之                    |
| 2. 発表標題<br>脂肪細胞における糖転移酵素ST6GAL1およびシアル酸付加による肥満の抑制効果 |
| 3. 学会等名<br>第39回日本肥満学会                              |
| 4. 発表年<br>2018年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>郡司一希、蕪木智子                                    |
| 2. 発表標題<br>トシカ豆香料が3T3-L1脂肪前駆細胞の分化およびアディポサイトカイン分泌能に与える影響 |
| 3. 学会等名<br>第75回日本栄養・食糧学会大会                              |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| <p>研究内容を公表しているWebサイト<br/>大東文化大学栄養学研究室 研究内容 <a href="https://www.kabulab-daito.com/work">https://www.kabulab-daito.com/work</a></p> |
|--|

6. 研究組織

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                  | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 日野 るみ<br><br>(Hino Rumi)<br><br>(60451770) | 大東文化大学・スポーツ健康科学部・教授<br><br><br>(32636) |    |

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)  | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                    | 備考 |
|-------------------|----------------------------|--|----|
| 研究<br>協<br>力<br>者 | 大塚 裕子<br><br>(Otsuka Yuko) | 大東文化大学・スポーツ健康科学部・特任助手<br><br><br>(32636) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|