

db/db マウス血清蛋白における *N*-結合糖鎖の $\alpha 1,6$ フコシル化の増加

学位論文内容の要旨

蛋白の *N* 結合糖鎖付加は翻訳後修飾の最も多いものの一つで、その中でフコシル化は細胞接着などの重要な現象を調節する。動脈硬化の初期段階に単球と血管内皮細胞の相互作用で $\alpha 1,3$ フコシル化された糖鎖構造が必要であり、動脈硬化に影響する。さらに慢性肝炎や肝硬変などの慢性肝疾患、肝癌で糖蛋白の $\alpha 1,6$ フコシル化が増加する。一方糖尿病では細小血管障害等の様々な合併症が生じ、動脈硬化性疾患や脂肪肝、悪性腫瘍などのリスクが高まる。これらの疾患と糖鎖構造変化との関連から、糖尿病と糖鎖構造変化を検討することは、その病態生理を明らかにするために重要である。現在までに 1 型糖尿病患者では糖尿病性腎症の指標であり、動脈硬化のマーカーでもある尿中アルブミン量の増加に伴って $\alpha 1$ 酸性糖蛋白の $\alpha 1,3$ フコシル化が増加する、2 型糖尿病患者でも $\alpha 1$ 酸性糖蛋白の $\alpha 1,3$ フコシル化が増加する傾向にあるとの報告がある。したがってフコシル化は糖尿病の合併症である細小血管障害や動脈硬化等に関連している可能性がある。

本研究では肥満 2 型糖尿病において血清糖鎖が変化する可能性を評価するために、肥満 2 型糖尿病モデルマウスとして *db/db* マウスを用いた。このマウスはレプチンレセプター遺伝子の変異のため、高レプチン血症を伴った過食、肥満となる。その結果インスリン抵抗性となり、膵 β 細胞が十分代償できず、高血糖が生じる。ヒトではこの変異は非常に稀だが、レプチン抵抗性を特徴とするヒトの肥満 2 型糖尿病の病態と類似している。

本研究の目的は *db/db* マウスを用いて特定の蛋白に限定せず、血清全体の蛋白の糖鎖を包括的に分析することにより、肥満 2 型糖尿病における主要な糖鎖変化を見いだすことである。

方法としては 9 週齢の *db/db* マウスの血清 50 μ l から peptide-*N*-glycosidase F で *N* 結合糖鎖を切り出し、2-aminopyridine で蛍光標識(pyridylamination, PA 化)した後にシアル酸を遊離した。octadecyl-bonded silica (ODS)カラムを用いて high-performance liquid chromatography (HPLC)分析を行い、主要なピークを分取し、さらに amide カラムで分析した。PA 化糖鎖の溶出位置は再現性のために、ラダーである PA 化イソマルトオリゴ糖で標準化されたグルコース単位 (glucose unit, GU)で示された。また PA 化糖鎖の量はピーク面積で計算された。さらに分取した糖鎖は質量分析も行われた。糖鎖構造は 2D 糖鎖マップ法、すなわち同一分析条件下に 2 種類の HPLC の溶出位置を比較して推定した。さらに肝臓、脂肪組織、腎臓から RNA を抽出し、逆転写酵素で first-strand cDNA を作成した後に、 $\alpha 1,6$ フコース糖転移酵素の mRNA の発現を定量的 real-time reverse transcription polymerase chain reaction で行い、Ribosomal RNA を用いて標準化した。

結果として *db/db* の *N* 結合糖鎖のプロファイルは ODS カラムを用いた HPLC でコントロール(*db/+*)と比較して溶出位置が GU で 8.1、9.7、10.3 の 3 つのピーク a、b、c では相対量が有意に減少し、逆に GU 11.2、13.2、14.0 の 3 つのピーク d、e、f で有意に増加していた(peak a, *db/db* 9.0% vs. *db/+* 12.8%; peak b, 9.6% vs. 13.3%; peak c, 34.0% vs. 43.2%, peak d, 4.4% vs. *db/+* 2.5%; peak e, 5.8% vs. 3.3%; peak f, 24.0% vs. 9.8%)。2D 糖鎖マップ法と糖鎖の質量を用いて各ピーク a から f の糖鎖構造を推定した。各ピーク d、e、f の構造は peak a、b、c の構造に α 1,6 フコース修飾を加えた糖鎖であり、 α 1,6 フコースの持つ糖鎖が *db/db* マウスでは増加していた。血清蛋白での α 1,6 フコシル化が増加した原因として肝臓、脂肪組織、腎臓の α 1,6 フコース糖転移酵素の mRNA の発現を調べたところ *db/db* マウスの肝臓で有意に増加していた。しかし脂肪組織と腎臓では有意差は認めなかった。

本研究で *db/db* マウスの血清蛋白で *N* 結合糖鎖の α 1,6 フコシル化が増加していることを示した。我々の知る限り肥満 2 型糖尿病と α 1,6 フコシル化の関係は以前に報告されていない。現在までの報告として α 1,6 フコシル化は機能として細胞接着、肝臓ライソゾームの酸性リパーゼ活性、形質転換成長因子(TGF)- β 1 シグナリング等を調節することが報告されている。このように *db/db* マウスの血清 α 1,6 フコシル化の増加は様々な糖蛋白の性質に影響を与え、いくつかの病態生理を反映している可能性がある。

以前に糖尿病患者の血清糖蛋白ではフコース含量の増加があると報告されたが、増加したフコースの結合部位は不明のままであった。また 2 型糖尿病患者の血清では α 1 酸性糖蛋白の α 1,3 フコシル化が以前増加する傾向にあることが報告されたが、今回我々は *db/db* マウスの血清の α 1,3 フコシル化が増加しているかどうかは示すことはできず、血清全体的な解析からこの変化はマウス血清ではよりマイナーな構造であることを示した。この相違は種差あるいは検体の違いによるのかもしれないが、ヒトにおいても全血清中の α 1,3 フコシル化はマイナーな構造であるという報告がある。 α 1,6 フコシル化は *N* 結合糖鎖生成の初期の段階で α 1,6 フコース糖転移酵素により糖蛋白と結合する非還元末端の GlcNAc 残基に付加され、マウス、ヒトともに血清 *N* 結合糖鎖の主な構成要素である。一方 α 1,3 フコシル化は生成経路の最後の段階で外側の分岐鎖の GlcNAc 残基に付加される。この 2 種類のフコシル化の役割はまだ明らかでないことが多いが、区別される必要がある。

α 1,6 フコース糖転移酵素の FUT8 は *N* 結合糖鎖に α 1,6 フコースを付加させる唯一の酵素である。本研究で *db/db* マウスの肝臓の FUT8 の mRNA のレベルはコントロールに比べて増加していた。今回 FUT8 の蛋白量や酵素活性は検討していないが、血清糖蛋白が主に肝臓で生成されることを考慮すると、血清 *N* 結合糖鎖の α 1,6 フコシル化が増加した理由としては FUT8 の酵素活性が増加した可能性がある。その酵素活性が増加した一つの原因として肝臓の FUT8 の mRNA のレベルが増加したことがあげられる。2 型糖尿病患者の肝臓では不十分なインスリン作用で様々な変化が生じ、その中には糖・脂質代謝に関連する多くの酵素も含まれる。これらの障害が FUT8 の mRNA のレベルを増加させている可能性もある。

db/db マウスで血清 *N* 結合糖鎖の α 1,6 フコシル化の増加と肝臓の FUT8 の mRNA の発現の増加が認められたが、肥満 2 型糖尿病、あるいはその合併症との関連を検証するために今後ヒトでの研究が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 島 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

db/db マウス血清蛋白における *N*-結合糖鎖の α 1,6フコシル化の増加

フコシル化は細胞接着などの重要な現象を調節している。 α 1,3フコシル化は動脈硬化における単球と血管内皮細胞の相互作用に関与しており、 α 1,6フコシル化は慢性肝疾患、肝癌で増加する。糖尿病と糖鎖に関する報告として1型糖尿病患者では尿中アルブミン量の増加に伴って α 1酸性糖蛋白の α 1,3フコシル化が増加する、2型糖尿病患者でも α 1酸性糖蛋白の α 1,3フコシル化が増加する傾向にあるとの報告があり、フコシル化は糖尿病の合併症である細小血管障害や動脈硬化等に関連している可能性がある。本研究では肥満2型糖尿病において血清糖鎖が変化する可能性を評価するために、肥満2型糖尿病モデルマウスとして*db/db*マウスを用いた。

本研究の目的は*db/db*マウスを用いて血清全体の蛋白の糖鎖を網羅的に分析することにより、肥満2型糖尿病における主要な糖鎖変化を見いだすことである。

方法としてマウス血清から peptide-*N*-glycosidase F で *N*結合糖鎖を切り出した後に蛍光標識化し、中性糖鎖とした。octadecyl-bonded silica (ODS)カラムを用いた HPLC 分析を行い、主要なピークを分取し、さらに amide カラムの分析と質量分析を行った。糖鎖構造は2次元糖鎖マップ法、すなわち同一分析条件下に2種類の HPLC の溶出位置を比較して推定する方法と質量より同定した。また各臓器の α 1,6フコース糖転移酵素の mRNA の発現を real-time RT-PCR 法で定量した。

結果として*db/db*の*N*結合糖鎖プロファイルは ODS カラムでコントロール(*db/+*)と比較して3つのピークで相対量が有意に減少し、別の3つのピークで有意に増加していた。2次元糖鎖マップ法と糖鎖の質量を用いて各ピークの糖鎖構造を同定したところ、増加したピークの糖鎖構造は減少したピークの糖鎖構造に α 1,6フコース修飾を加えた糖鎖構造であった。肝臓、脂肪組織、腎臓の α 1,6フコース糖転移酵素の mRNA の発現を調べたところ*db/db*マウスの肝臓のみで有意に増加していた。

本研究で*db/db*マウスの血清蛋白で*N*結合糖鎖の α 1,6フコシル化が増加していることを示した。この血清 α 1,6フコシル化の増加は様々な糖蛋白の性質に影響を与え、いくつかの

病態生理を反映している可能性がある。血清糖蛋白が主に肝臓で生成されることを考慮すると、肝臓の $\alpha 1,6$ フコース糖転移酵素の活性が増加した可能性があり、その一つの原因として肝臓の $\alpha 1,6$ フコースの mRNA のレベルが増加したことがあげられる。また今回の網羅的な解析で $\alpha 1,3$ フコシル化はマイナーな構造であることを示した。 $\alpha 1,6$ フコシル化の増加が *db/db* マウスのどの病態と関連しているのか今回の検討では不明である。今後は肥満 2 型糖尿病、あるいはその合併症との関連を検証するためにヒトでの研究が必要である。

審査にあたり副査小池教授から、1) *db/db* マウスの血清糖鎖変化を起こす病態について (肥満や脂肪肝、または糖尿病、あるいは遺伝的な背景が関与しているのかどうか)、2) ストレプトゾトシンを使った 1 型糖尿病モデルマウスの糖鎖変化について、3) 糖鎖変化を起こす原因として高血糖なのか肥満なのかを区別することについての質問があった。また副査畠山教授から 1) 糖鎖構造の同定の困難さについて、2) $\alpha 1,6$ フコース糖転移酵素の活性増加と糖蛋白の機能変化について、3) $\alpha 1,6$ フコース糖転移酵素のノックアウトマウスについての質問があった。最後に主査西村教授より、1) コントロールにヘテロを使う妥当性について、2) 肝臓で $\alpha 1,6$ フコース糖転移酵素が増加した原因について、3) $\alpha 1,6$ フコシル化のターゲット蛋白について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自験データや過去の文献を引用し、概ね適切に回答した。質疑応答の時間は約 15 分であった。

この論文は肥満 2 型糖尿病モデルマウス *db/db* を用いて血清の $\alpha 1,6$ フコシル化の増加という糖鎖変化を見出した研究であり、今後 $\alpha 1,6$ フコシル化と *db/db* マウスの病態生理との関係、さらに $\alpha 1,6$ フコシル化された糖蛋白の機能解析、さらにヒトにおける肥満や糖尿病などの糖鎖変化を検討する基礎になるデータである。

審査員一同は、この成果を高く評価し、大学院における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。