

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07787

研究課題名(和文)食品イソチオシアネート化合物による骨格筋の機能的・量的維持に対する有効性解析

研究課題名(英文)Effect of isothiocyanates from cruciferous vegetables on regulation of glucose and protein metabolism in skeletal muscle

研究代表者

伊藤 芳明 (ITO, Yoshiaki)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：50312517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：クレソン等に含まれるphenethyl isothiocyanate (PEITC)は、解毒や抗酸化活性を有していることが知られている。本研究では、マウス骨格筋由来細胞であるC2C12細胞を用いた解析から、新たな機能性としてErbB-Aktシグナルの活性化を介した糖取り込み促進作用を有することを見出した。加えて、PEITCによるAktの活性化はタンパク質分解抑制にも関与することも示唆された。本成果は、骨格筋の糖代謝器官である機能的側面と運動や体を支持する体組織としての量的側面に同時にアプローチするものであり、本機能を活用した疾患予防への食品機能的な応用への発展も期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋は生体の糖代謝調節を担う主要な器官であると同時に、生体の活動を担う器官である。その機能低下は、糖尿病等の生活習慣病の要因やフレイルなどの自立的な活動力の低下に繋がる。本研究では、骨格筋細胞を用いた解析によりアブラナ科野菜などに含まれるイソチオシアネート化合物に糖利用を促進する効果と筋タンパク質の分解を抑制する効果があることを明らかにした。この成果は、日常的に摂取する機会の多い野菜類の健康有益性を明らかにするものであり、生体での疾患の予防や緩和などの応用研究の基礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：Phenethyl isothiocyanate (PEITC) is known to be contained in some cruciferous vegetables like watercress and has detoxification and antioxidant activity. In the present study, we found that it has a new function of promoting glucose uptake through activation of ErbB-Akt signal from the analysis using C2C12 cells, which are derived from mouse skeletal muscle. In addition, it was suggested that activation of Akt by PEITC is also involved in suppression of muscle protein degradation. These results provide a new approach simultaneously for the functional aspects of skeletal muscles, which are the glucose metabolism organs, and the quantitative aspects of tissues that support exercise and the body mass. And it can be expected to develop into further applications for prevention of lifestyle-related diseases with food.

研究分野：栄養化学

キーワード：骨格筋 イソチオシアネート 食品機能 糖代謝 タンパク質代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は生体の糖代謝調節を担う主要な器官である。糖尿病等の糖代謝不良時には筋肉でのインスリン抵抗による耐糖能の低下が高血糖の要因の一つとなる。また、加齢と共に筋肉量が低下することも高齢時の活動の低下を招き、糖消費の低下、ひいては血糖上昇の要因となる。従って、骨格筋における糖利用活性の維持やそのための量的・機能的な筋肉の維持は糖尿病等の疾患の予防や緩和にも繋がり、我々の健康維持にとって重要である。

アブラナ科野菜に含まれるイソチオシアネート化合物は、抗酸化・解毒活性を誘導する効果があることはよく知られている。研究代表者はこれら抗酸化機能とは別に、肝臓細胞において西洋わさびやクレソン等に含まれる phenethyl isothiocyanate (PEITC) が Akt や Erkなどを介したインスリン様活性(糖新生抑制作用)を有することを明らかにしている。一方、骨格筋はギブス固定などの不使用で萎縮が起こるが、この萎縮の要因の1つに酸化ストレスの増加が指摘されている。抗酸化物質による骨格筋の萎縮抑制効果はアスタキサンチンなどで例はあるが、イソチオシアネート化合物での報告はない。PEITCは骨格筋のタンパク質分解の抑制シグナルである Akt の活性化と抗酸化機能誘導活性を持つことから、酸化ストレス負荷を伴う筋分解に対して高い保護効果が期待できるがその効果は不明であった。

2. 研究の目的

上記の背景を元に、本研究ではアブラナ科野菜の食材に含まれるイソチオシアネート化合物の健康有益性の評価研究として、最大の糖消費器官であり、運動などの活動を支える重要器官でもある骨格筋の機能維持に対する効果と作用機序を明らかにすることを目的として、1. 骨格筋モデル細胞であるマウス C2C12 細胞を用いた、PEITC のインスリン様作用評価とその作用発現機序の解明、2. 骨格筋の維持・分解抑制に対する PEITC の有効性評価とその機序の解析、について取り組むこととした。以上から、PEITC の骨格筋に対する代謝調節機能と量的維持効果に関して、その有効性と分子的な基盤を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) PEITC による骨格筋細胞における代謝調節機能に関する解析方法

マウス骨格筋由来細胞 C2C12 細胞を分化誘導後、無血清培地で 18 時間培養した後、種々の濃度の PEITC により処理した。処理後、lysate を調製し、Western blotting による細胞内シグナル分子の応答を解析した。PEITC による糖取り込み活性の評価としては、24 well plate を用いて、分化誘導した細胞をフェノールレッドを含まない培地 250 μ l/well に交換し、6 時間 PEITC 処理をした。6 時間後、培地を回収し、市販のグルコース測定用キットにて培地中のグルコース量を測定し、元の培地に含まれるグルコース量と培養後の残存グルコース量から取り込み量を算出した。

(2) PEITC による骨格筋細胞における量的維持効果に関する解析方法

分化誘導した C2C12 細胞を PBS (-) で洗浄した後、アミノ酸飢餓培地に交換し、PEITC を種々の濃度で処理をした。4 時間後、培地を回収し、3-MeHis 放出速度の測定に用いた。また、lysate を調製し、Western blotting によりユビキチンリガーゼの発現量の分析に供した。

(3) 統計処理

データは平均値 (AVG) と標準誤差 (SEM) で表し、有意差は Macintosh Instat 3.0 を使用し、Tukey multiple comparison post test により判定し、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) PEITC による骨格筋細胞における代謝調節機能に関する効果とその作用機序

C2C12 細胞を分化誘導後、PEITC 刺激したときのシグナル応答について、濃度依存的な変化を Western blotting にて追跡したところ、図 1 に示すように Akt の活性化が認められた。

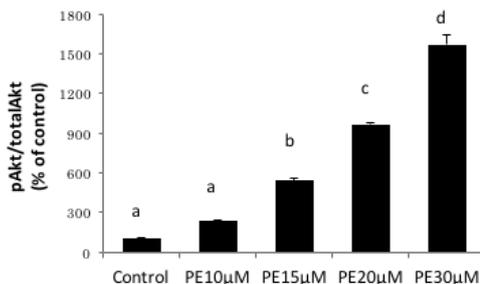


図 1 C2C12 細胞における PEITC 刺激による Akt 活性の変化
細胞を種々の濃度で 180 分間刺激したときの Akt 応答の濃度依存的な変化を示す。
値は Avg \pm SEM (n=4)、異なる記号間で有意差あり (p<0.05)。

Akt は、インスリンのグルコース取り込みの促進作用発現の上で重要な役割を果たしている。そこで PEITC による Akt の活性化が細胞内へのグルコース取り込みに関与しているかを検討したところ、図 2 に示すように PEITC を 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M で 6 時間処理した群において、

control 群に比べて有意なグルコースの取り込み量の上昇を認めた。

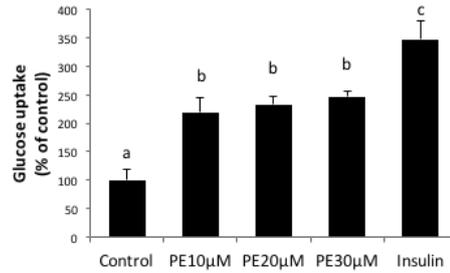
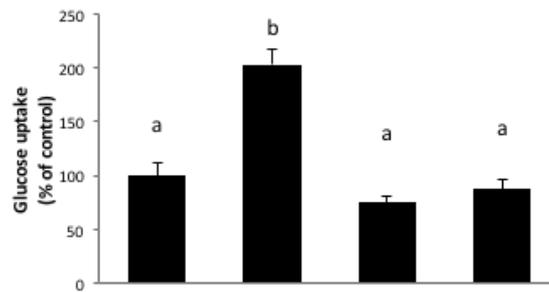


図2 PEITC で刺激したときの細胞内グルコース取り込み応答値は Avg±SEM (n=3-4), 異なる記号間で有意差あり (p<0.05)。

次に、PEITC によるグルコース取り込み量における Akt の役割を明確にするために、PEITC 刺激時に Akt を阻害したときのグルコース取り込み活性に及ぼす影響を検討した。その結果、PEITC 処理により増加したグルコース取り込み量が、Akt 阻害剤である Akt inhibitor の同時処理によって有意に減少していることが明らかとなった (図3)。

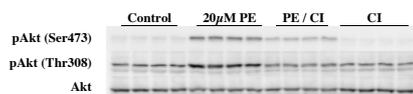


PEITC (20uM) - + + -
Akt inhibitor (1.5uM) - - + +

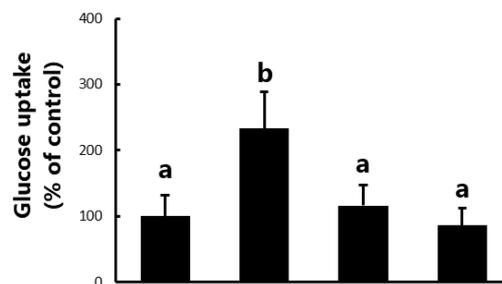
図3 Akt 阻害剤が PEITC 刺激によるグルコース取り込みに及ぼす影響
PEITC 20 µM、Akt 阻害剤 1.5 µM で 6 時間処理したときのグルコース取り込み量の変化を相対値で示した。値は Avg±SEM (n=5~6)、異なる記号間で有意差あり (p<0.05)。

次に、PEITC による Akt 活性化に関わる上流因子の解析を行った。これまで PEITC により 180kDa 付近のタンパク質のリン酸化応答が起こることを明らかにしていたので、各種シグナル分子を検索したところ、ErbB 受容体が関与している可能性が考えられた。そこで、ErbB 受容体阻害剤で処理した際の PEITC による Akt 活性への影響を検討したところ、図4Aに示すように抑制が認められ、ErbB 受容体の関与が明らかになった。さらに PEITC 処理によるグルコース取り込みに対する ErbB 受容体阻害剤の影響を検討したところ、ErbB 受容体阻害剤により PEITC の効果が打ち消されることが明らかとなった (図4B)。したがって、PEITC は ErbB 受容体を介して Akt を活性化し、グルコース取り込みを促進していることが分かった。

(A)



(B)



PEITC (20uM) - + + -
CI-1033 (2.5uM) - - + +

図4 ErbB 阻害剤が PEITC 刺激による Akt 及びグルコース取込み活性に及ぼす影響
(A) C2C12 細胞を PEITC 20 µM、あるいは ErbB 受容体阻害剤 CI-1033 2.5 µM の共

存下で 180 分間処理した時の Akt の応答変化、(B) PEITC(20 μ M)で 6 時間処理したときのグルコース取り込み活性の変化

(2) PEITC による骨格筋細胞における量的維持効果とその作用機序

Akt の活性化は筋タンパク質の分解抑制することが知られていることから、Akt を活性化する PEITC は骨格筋萎縮の抑制に寄与する可能性がある。そこで、PEITC が C2C12 細胞のタンパク質分解に及ぼす影響を検討するため、筋原線維タンパク質分解の指標として用いられる 3-メチルヒスチジン(3-MeHis)の培地中への放出量を測定した。その結果、PEITC を 10, 20 μ M で 4 時間処理した際の培地中への 3-MeHis 放出速度に抑制が認められた (図 5)。

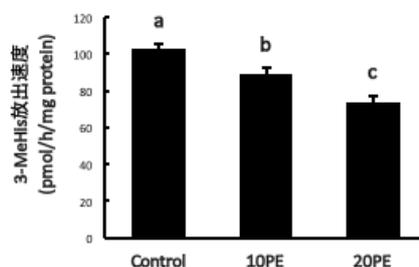
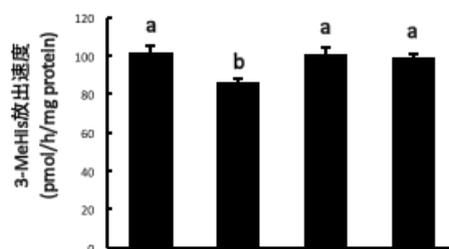


図 5 PEITC 処理による 3-MeHis 放出速度への効果
PEITC 10 μ M, 20 μ M で 4 時間処理後の培地中の 3-MeHis 放出量を測定した。値は Avg \pm SEM (n=4)、異なる記号間で有意差あり (p<0.05)。

次に PEITC による Akt の活性化が、3-MeHis の放出抑制に寄与しているかを Akt 阻害剤を用いて検討した。その結果、図 6 に示すように Akt 阻害剤 1.5 μ M の添加により、PEITC による培地中への 3-MeHis 放出速度抑制効果が打ち消された。したがって、PEITC のタンパク質分解抑制効果に Akt が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。



PEITC (20 μ M)	-	+	+	-
Akt inhibitor (1.5 μ M)	-	-	+	+

図 6 Akt 阻害剤が PEITC による 3-MeHis の放出速度抑制効果に与える影響
PEITC 20 μ M, Akt 阻害剤 1.5 μ M で細胞を 4 時間処理した際の培地中の 3-MeHis 放出量を測定した。値は Avg \pm SEM (n=4)、異なる記号間で有意差あり (p<0.05)。

PEITC によるタンパク質分解抑制の作用機序の解析として、ユビキチンリガーゼ発現量への影響を検討した。図 7 に示すように、PEITC 処理により減少した atrogen-1 の発現量が Akt 阻害剤を併用処理することで有意に増加していた。このことから、PEITC は Akt を介して atrogen-1 の発現を抑制し、3-MeHis 放出の抑制につながっている可能性が示唆された。



図 7 Akt 阻害剤が PEITC 刺激によるユビキチンリガーゼ発現抑制効果に及ぼす影響
PEITC 20 μ M、4 時間処理した時の Atrogen-1 発現を Western blotting で検出した。

以上から、PEITC は骨格筋細胞において ErbB 受容体を介して Akt を活性化し、糖取り込みの促進する活性を有すること、さらにユビキチンリガーゼの発現抑制による筋タンパク質分解の抑制効果を持つことが明らかとなり、骨格筋に対する代謝調節機能と量的維持効果を有する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Chiba Maiko, Ito Yoshiaki, Nagasawa Takashi	4. 巻 83
2. 論文標題 Phenethyl isothiocyanate stimulates glucose uptake through the Akt pathway in C2C12 myotubes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1319 ~ 1328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1594675	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔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 後藤みのり、伊藤芳明、長澤孝志
2. 発表標題 低タンパク質食による肝臓脂質蓄積へのPEITCの効果
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第13回学術大会(JSAAS2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉麻衣子、伊藤芳明、長澤孝志
2. 発表標題 骨格筋細胞におけるフェネチルイソチオシアネートの筋タンパク質分解抑制効果の評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉麻衣子、伊藤芳明、長澤孝志
2. 発表標題 骨格筋細胞におけるフェネチルイソチオシアネートの糖取り込み促進活性の評価
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----