

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K13036

研究課題名(和文) 食材ポリアセチレン化合物による糖新生抑制効果と統合的代謝調節機構の解析

研究課題名(英文) Effect of polyacetylene compounds from Apiaceae vegetables on regulation of glucose metabolism in hepatocyte

研究代表者

吉田 潤 (Yoshida, Jun)

岩手医科大学・教養教育センター・助教

研究者番号：20611007

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)：セリ科野菜やウコギ科山菜に含まれるポリアセチレン化合物falcarindiol類は、抗菌活性や抗がん活性を有することが知られている。本研究では、ラット肝がん由来細胞株H4IIEを用いた解析により、falcarindiol類がインスリンシグナル伝達経路の下流に位置するGSK-3 や栄養シグナル経路に関わるタンパク質リン酸化酵素群のリン酸化状態に影響を与えて糖新生を抑制する作用機序が示唆された。本成果は、糖尿病態において活性亢進がみられるGSK-3 活性を調節する食品機能性物質の基礎研究であると共に、疾患予防への応用も期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、セリ科野菜やウコギ科山菜等に含まれるポリアセチレン化合物のインスリンシグナル伝達経路や栄養シグナル経路に対する作用機序の一部を明らかにした。本成果は、falcarindiolの食品機能性物質としての科学的根拠の一部を提供すると共に、肝細胞における糖代謝を中心としたエネルギー代謝調節機構の分子メカニズムの解明と生活習慣病の新たな改善法の確立に寄与するものである。また、日常的に摂取する機会の多いセリ科野菜の食品機能性素材としての有益性を明らかにし、ウコギ科山菜の可食部及び成長体の薬用植物資源としての有効活用に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The polyacetylene compounds falcarindiol contained in Apiaceae vegetables and Araliaceae edible wild plants are known to have antibacterial activity and anticancer effect. In this study, analysis using rat hepatoma cell line H4IIE suggested that falcarindiol suppressed GSK-3 in the insulin signaling pathway. These results are a basic research of a food functional substance that regulates GSK-3 activity, which is hyperactive in diabetic conditions, and is expected to be applied to disease prevention.

研究分野：応用生物化学、生物分子化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：Falcarindiol 機能性物質 GSK-3 インスリン 糖新生 セリ科植物 肝細胞 ポリアセチレン化合物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病はインスリン抵抗性と膵島機能不全によるインスリン作用不足を要因とする高血糖状態で、糖尿病全体の 90%以上を占めている。2 型糖尿病は一度発症すると治癒することが難しく、神経障害、網膜症、または腎臓障害等の様々な合併症を引き起こすことから、その予防・治療法の開発は重要である。近年、新たな作用機序に基づく 2 型糖尿病予防・治療剤の有効成分として、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)) を阻害する物質が注目されている。GSK-3 はインスリンシグナル伝達の下流に位置するタンパク質リン酸化酵素で、インスリン作用によるシグナル伝達により不活性化される。GSK-3 は糖尿病態においては過剰な活性化がみられ、その阻害剤を実験動物に投与すると高血糖状態が改善される効果が認められている。これまでに合成化合物を中心として様々な GSK-3 阻害物質が見出されてきたが、食材由来の GSK-3 阻害物質の研究は現在のところほとんど進んでいない。食材由来の GSK-3 阻害剤は抗 2 型糖尿病効果が期待される食品機能性物質としての応用可能性があることからその探索研究は重要である。

これまでに、遺伝子変異酵母株 YNS17(*zds1 erg3 pdr1 pdr3*) の生育回復を活性の指標とする新規な薬剤スクリーニング技術を用いて食材に含まれる GSK-3 阻害物質を探索してきた。その結果、セリ科野菜やウコギ科山菜に含まれるポリアセチレン化合物のファルカリンジオールに GSK-3 阻害活性を見出した。抗糖尿病効果に関わる機能性を検討した結果、ラット肝臓由来細胞株 H4 E における糖新生律速酵素の遺伝子発現がファルカリンジオールの作用により抑制された。また、糖尿病モデルラットにセリ抽出物を投与すると血糖値の上昇を抑制する可能性が示唆された。これまでの、肝細胞や糖尿病モデル動物を用いた機能性評価から、ファルカリンジオールを含む食材は高血糖改善効果を示す有望な天然資源であると期待できる。

2. 研究の目的

セリ科野菜やウコギ科山菜から得られるポリアセチレン化合物ファルカリンジオールは肝臓由来細胞株や糖尿病モデル動物を用いた機能性評価から、ヒトに対する高血糖改善効果が期待できる生物活性物質である。しかし、肝細胞における糖新生抑制作用の作用機構の詳細は明らかになっていない。本研究は、ファルカリンジオールの糖代謝調節機構に関わるインスリンシグナル伝達経路、エネルギーセンサー系、並びにタンパク質合成/分解系に関わる栄養シグナル経路に対する作用機構を肝臓由来細胞株を用いて明らかにすることを目的とした。また、より高活性の機能性物質を探索するために、遺伝子変異酵母株 YNS17 を用いた薬剤スクリーニング系や GSK-3 阻害アッセイを用いて、山菜として食されている各種ウコギ科植物に含まれる物質の生物活性評価を行った。具体的には、次の(1)～(5)について食材ポリアセチレン化合物の糖代謝調節機構に関する作用機構を中心に解析した。

- (1) 肝臓由来細胞株におけるインスリンシグナル伝達経路に対する作用機構の解析
- (2) 肝臓由来細胞株における栄養シグナルに対する作用機構の解析
- (3) ファルカリンジオール構造類縁体の糖新生抑制作用の検討
- (4) ウコギ科植物を中心とした天然資源抽出物の生物活性評価
- (5) 天然資源由来の各種生物活性物質の肝臓由来細胞株に対する作用特性の解析

3. 研究の方法

(1) 肝臓由来細胞における糖新生に関わるシグナル伝達経路に対する作用解析

H4 E 細胞を 12-ウェルマイクロプレートに播種して 2 日間培養後、無血清培地に交換して一晚培養した。その後、様々な濃度のファルカリンジオール類または各種市販の阻害剤等を培地に加えて培養し、FoxO ファミリー転写因子などのインスリンシグナル伝達経路の下流に位置する糖新生の調節機構に関連したシグナル伝達分子のタンパク質発現レベルとタンパク質リン酸化レベルをウエスタンブロット法で調べて活性化と不活性化を解析した。

(2) 肝臓由来細胞株におけるグルコース産生抑制作用の解析

H4 E 細胞を 12-ウェルマイクロプレートに播種して 2 日間培養後にデキサメタゾンとジブチリル cAMP を含む無血清 DMEM 培地に交換した。そこに、様々な濃度のファルカリンジオール類または GSK-3 阻害剤等の各種市販の阻害剤を培地に添加して 24 時間培養した。その後、ピルビン酸ナトリウムと乳酸ナトリウムを添加したグルコース・フェノールレッド不含培地に交換して 4 時間培養後、培地へのグルコース放出量をグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ法で測定した。

(3) 肝臓由来細胞における栄養シグナル経路に対する作用解析

H4 E 細胞を 12-ウェルマイクロプレートに播種して 2 日間培養後、無血清培地に交換して一晚培養した。その後、様々な濃度のファルカリンジオール類または各種市販の阻害剤等を培地に加えて培養し、AMPK 経路や mTOR 経路に関わるシグナル伝達の主要分子のタンパク質発現レベル

とタンパク質リン酸化レベルをウエスタンブロット法で調べて活性化と不活性化を解析した。

(4)ウコギ科植物抽出物の生物活性評価

岩手県の森林よりウド、タラノキ、コシアブラ、ハリギリ、ヤマウコギの5種のウコギ科山菜を春季に採集または購入し食用部位と非食用部位(葉、茎、枝等)に分けて乾燥後、それぞれの天然資源をメタノール抽出した。得られたメタノール抽出物を濃縮乾固後、メタノールに再溶解して10 mg/mlのスクリーニングサンプルを調製した。また、夏季に同種の植物体を採集して各植物部位の成長体についても同様にメタノール抽出物を調製した。これらスクリーニングサンプルとし、それぞれCa²⁺超感受性の遺伝子変異酵母株 YNS17(*zds1 erg3 pdr1/3*)における生育回復活性を検討した。スクリーニングは、0.3 M CaCl₂を含むYPD寒天培地にYNS17株を混合してディッシュに流し込み培養プレートとし、各種スクリーニングサンプルを5 µg/spotで添加後28で3日間培養した。その後、高濃度Ca²⁺による増殖阻害から生育回復した遺伝子変異酵母株により生じた生育円の有無を観察した。

(5)天然資源由来の生物活性物質の肝臓由来細胞株に対する作用特性の比較解析

植物抽出物由来または微生物培養液由来の新規低分子化合物について、ポリアセチレン化合物類と同様の実験系を用いて生物活性評価を行い、その作用特性を比較してファルカリンジオール類の作用機序に関する総合的な検討を行った。天然資源由来の新規低分子化合物をH4IE細胞に作用させ顕微鏡により形態変化と細胞増殖を経時的に観察すると共に、細胞毒性をMTTアッセイにて測定した。また、一部の化合物についてはGSK-3阻害活性、並びにH4E細胞におけるグルコース産生抑制作用を解析し食材ポリアセチレン化合物類との作用機序を比較検討した。

(6)糖新生抑制作用を示すヒドロキシ脂肪酸類の生物活性の解析

食材ポリアセチレン化合物と類似の生物活性を示すヒドロキシ脂肪酸類について、その構造活性相関を明らかにすることで活性に重要な官能基を明らかにすることを目的とした。ヒマシ油から得られるヒドロキシ脂肪酸リシノール酸とその各種誘導体のCa²⁺感受性の遺伝子変異酵母株 YNS17(*zds1 erg3 pdr1/3*)における生育回復活性を検討した。CaCl₂を加えたYPD寒天培地プレートでYNS17株を28培養し、ペーパーディスク法にて生育円の大きさを測定した。また、遺伝子変異酵母株 YNS17に対して生育回復活性を示した脂肪酸類についてH4E細胞における糖新生抑制作用を解析するためにデキサメタゾン/ジブチリルcAMP処理で糖新生刺激したH4E細胞に活性を示した脂肪酸類を処理して24時間培養し、培地交換後4時間で培地中に放出されたグルコースをグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ法で定量した。

4. 研究成果

(1)肝臓由来細胞におけるインスリンシグナル伝達経路に対する作用機構の解析

H4E細胞にインスリンを作用させると、Aktリン酸化、GSK-3リン酸化、およびp70S6Kリン酸化の顕著な増加がみられた。また、同様にGSK-3阻害剤TDZD-8をH4E細胞に作用させると、GSK-3とp70S6Kのリン酸化レベルの増加が認められた。同条件下で、ファルカリンジオールを1時間作用させた結果、GSK-3リン酸化とp70S6Kのリン酸化の増加が認められたが、Aktリン酸化はインスリンと同程度の顕著な増加がみられなかった。しかし、溶媒対照群と比較するとAktリン酸化レベルの有意な増加が認められた。インスリンと同程度の顕著なAktリン酸化レベルの上昇は認められないものの、Aktシグナル伝達の上流に対しても二次的な作用が存在する可能性が示唆された。今後は経時的な変化を検討する必要がある。また、ファルカリンジオールとmTORC1阻害剤を共処理するとグルコース産生抑制効果が打ち消された。一方で、ファルカリンジオールとPI3K阻害剤、Akt阻害剤との共処理では糖新生抑制作用が明確には打ち消されなかったことから、その標的分子はGSK-3等のAktより下流の分子への作用が主作用である可能性が高いが、作用機構の全容を明らかにするためにはその他のシグナル伝達経路に対する作用についても総合的に解析する必要がある。

(2)肝臓由来細胞におけるファルカリンジオール構造類縁体のグルコース産生抑制作用の解析

デキサメタゾンとジブチリルcAMP混合溶液で糖新生を活性化したH4E細胞にインスリンを処理して培養すると、培地中へのグルコース放出量が溶媒対照群と比較して約90%抑制された。同条件下でファルカリンジオール構造類縁体の1種であるファルカリノールをH4E細胞に処理して培養すると、培地中へのグルコース放出量が溶媒対照群と比較して抑制され、ファルカリノールと同程度の濃度で濃度依存的な有意差が認められた。また、各種GSK-3阻害剤のグルコース放出量の抑制率を測定した結果、ATP拮抗型阻害剤のBIOやATP非拮抗型阻害剤のTDZD-8によりファルカリノール類と同程度の濃度で有意に抑制された。これらの結果から、ファルカリノールはグルココルチコイドとcAMPの作用で惹起される肝細胞のグルコース産生を抑制し、その活性は酵素反応で強力なGSK-3阻害剤であるBIOと同等の濃度で作用することが示唆された。以上の結果から、ファルカリノールとファルカリノールは試験管内での酵素反応におけるGSK-3阻害活性は既存のGSK-3阻害剤と比較して強力な阻害活性ではないが、肝臓由来細胞においては既存のGSK-3阻害剤と同程度の作用濃度で糖新生抑制効果を示す可能性が

得られた。以上の結果は、セリ科野菜やウコギ科山菜を機能性食品素材として応用する際に、各種ポリアセチレン化合物含有量の総量も重要であり、各種成分の吸収効率や体内動態の差について検討していくことが課題となる。

(3)ウコギ科植物抽出物の生物活性評価

ウコギ科山菜の食用部位及び成長体の抗 2 型糖尿病効果に関わる生物活性を評価した。岩手県の森林よりウドやタラノキなど 5 種のウコギ科山菜を春季と夏季に採集し、メタノール抽出物を調製して遺伝子変異酵母株 YNS17 に対する生育回復活性をスクリーニングした。活性評価したメタノール抽出物のうちウドとヤマウコギに YNS17 株の生育回復活性が認められ、いずれも夏季に採集した天然資源でも活性が認められた。これらの結果から、ウドは山菜として春季に得られる若芽の食用部位だけでなく、食用時期を過ぎて大型化した成長体についても食品機能性素材や薬用植物資源として有効活用できる可能性が得られた。

(4)天然資源由来の新規化合物の肝細胞に対する作用特性の比較解析

植物内生菌培養液由来の新規化合物と植物由来の新規化合物を H4 E 細胞に作用させ 48 時間培養後 MTT アッセイと顕微鏡観察で細胞増殖を解析した結果、アフリカ原産植物から得られた新規サポニン類が H4 E 細胞の細胞膜の状態の変化を誘導するとともに高濃度処理で増殖促進活性を示す現象がみられた。一方で、それらの化合物の構造類縁体の一部は細胞膜の状態の変化と増殖促進活性を示さない化合物もみられた。構造活性相関を比較するとアグリコンに結合する官能基の種類によるものと考えられるが、そのメカニズムは今後検討していく必要がある。特にミトコンドリア活性に対する影響等の H4 E 細胞に対する作用メカニズムの解析が重要である。今後は、食材ポリアセチレン化合物類との作用の比較及び共処理による相乗効果などを解析し機能性物質としての可能性を検討していく。

(5)糖新生抑制作用を示すヒドロキシ脂肪酸類とファルカリンジオールとの生物活性の比較

ヒマシ油から得られるヒドロキシ脂肪酸のリシノール酸(RA)は、Ca²⁺感受性を示す酵母の変異株 YNS17 を用いたスクリーニング系において各種脂肪酸の中で特に強力な生育回復活性を示した。RA はヒト GSK-3 を *in vitro* で基質(リン酸化 GS ペプチド基質)拮抗的に阻害し($K_i=1.43 \mu\text{M}$)、糖新生活性を誘導した H4IIE 細胞のグルコース産生を 25 μM で濃度依存的に抑制した。さらに、H4IIE 細胞に RA 100 μM を 1 時間作用させると、リン酸化による Akt を介さずに GSK-3 のリン酸化による不活性化が亢進した。この時、GSK-3 の基質であるグリコーゲンシンターゼのリン酸化が減少し、 β -catenin の増加が認められたことから、RA は H4IIE 細胞で直接的に GSK-3 を阻害することが示唆された。各種 RA 構造類縁体の生物活性を比較してその構造活性相関を明らかにするためにプロテインキナーゼ阻害プロファイリングは、ヒト GSK-3 と合成ペプチド基質を用いた Mobility shift assay によるパネル解析にて測定した。RA の 35 種類のセリン/スレオニンプロテインキナーゼに対する阻害活性を測定した結果、50 μM で 50%以上阻害されたキナーゼが RA で 9 種類認められた。このうち、生細胞内 ATP 濃度を指標とした条件下で約 50%以上阻害されたキナーゼが、RA で 4 種類認められた。培養細胞における糖新生抑制試験は、糖新生を活性化した H4 E 細胞が培地中に放出するグルコースをグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ法で定量した。糖新生抑制試験では、RA 構造類縁体のうちヒドロキシ基をもつ飽和脂肪酸類と RA のトランス異性体のリシネライジン酸が濃度依存的に H4IIE 細胞のグルコース産生を抑制した。以上の結果から、RA の標的分子として GSK-3 が示唆され、RA の抗糖尿病の機能性脂質としての可能性を見出すことができた。また、RA の活性にはヒドロキシ基が重要であり、ヒドロキシオクタデカン酸類は抗糖尿病効果を有する可能性が得られた。ヒドロキシ脂肪酸類の作用は食材ポリアセチレン化合物類の作用機序と類似しており、これらを比較解析することで両化合物の作用機構の全容解明に繋げていく。

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tchoukoua A., Douanla M. H., Ariefita N. R., Yoshida J., Ito Y., Ngadjui B. T., Shiono Y.	4. 巻 151
2. 論文標題 Triterpene saponins from the roots of <i>Acacia senegal</i> (L.) Willd	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 104859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fitote.2021.104859.	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 該当する

1. 著者名 Tchoukoua A., Tomfeun Nganou S. C., Dabole B., Yoshida J., Ito Y., Ngadjui B. T., Shiono Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 Polythosides A and B, two new triterpenoid saponins from the roots of <i>Acacia polyacantha</i> Willd. (Mimosaceae)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 190 ~ 195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

1. 著者名 Yoshida J., Okawa Y., Oyama T., Shimoda N., Uesugi S., Takagi H., Ito Y., Kimura KI.	4. 巻 55
2. 論文標題 Inhibition of Calcineurin and Glycogen Synthase Kinase 3 by Ricinoleic Acid Derived from Castor Oil	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 89 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lipd.12208.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉田 潤、上杉 祥太、箱崎 真友佳、藤澤 日土美、伊藤 芳明、木村 賢一
2. 発表標題 肝細胞糖産生を抑制するヒドロキシ脂肪酸ricinoleic acid類の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshida Jun、Kudo Yui、Ito Yoshiaki、Kimura Ken-ichi
2. 発表標題 Effects of falcarindiol from Apiaceae vegetables on the gluconeogenesis in hepatoma cells
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 潤、大川 佑介、小山 卓矢、下田 希、上杉 祥太、高木 博史、伊藤 芳明、木村 賢一
2. 発表標題 ヒマシ油由来のヒドロキシ脂肪酸ricinoleic acidのcalcineurinとGSK-3 に対する阻害作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島津 優人、小山 卓矢、上杉 祥太、川島 英城、吉田 潤、大野 美紗、渡辺 大輔、高木 博史、木村 賢一
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼ遺伝子変異酵母rsp5A401E株に活性を示す脂肪酸類の二面性
3. 学会等名 日本農芸化学会東北・北海道合同支部大会(東北支部第153回大会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------