

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：33604

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05935

研究課題名（和文）血糖低下作用を示す食品成分のスクリーニングと作用機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of action mechanisms of food constituents that decrease of the blood glucose level.

研究代表者

高木 勝広（TAKAGI, KATSUHIRO）

松本大学・大学院 健康科学研究科・教授

研究者番号：80279562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：インスリンは、肝で糖新生系酵素 phosphoenolpyruvate carboxykinase をコードする遺伝子の転写を抑制することにより血糖低下に寄与している。本研究目的は、唯一の血糖低下ホルモンであるインスリンの作用を模倣する食品由来の低分子化合物を自然界から見つけ出し、分子生物学的手法を用いて作用機構を解明することである。私どもは、ブロッコリーの成分でイソチオシアネート類のスルフォラファンや、ウコンの成分でポリフェノール類のクルクミンが PEPCK 遺伝子の発現誘導を抑制することを明らかにした。さらに、それらの食品成分による PEPCK 遺伝子の発現抑制メカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに、わさびの辛み成分でイソチオシアネート化合物である 6-MSITC が、ラット初代培養肝細胞において PEPCK 遺伝子の発現抑制を示してきた。さらに今回、スルフォラファンによる血糖低下作用を科学的に証明することができれば、血糖低下作用を有する化学構造の特異性を論じることができる。インスリン以外の生理活性物質、特に食品成分によって、生体内の PEPCK 遺伝子の発現を抑制できれば、血糖低下が生じると期待できる。そうすれば、糖尿病患者の治療や発症の予防になることに加え、生活習慣病をもたらすメタボリックシンドロームの原因である肥満をも予防できると思われる、その社会的意義は計り知れない。

研究成果の概要（英文）：Insulin contributes to blood glucose reduction by suppressing transcription of the gluconeogenic enzyme encoding the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in the liver. Our research purpose is to find food-derived low-molecular-weight compounds that mimic the action of insulin, the only hypoglycemic hormone and to elucidate their mechanism of action using molecular biological techniques. It was revealed that an isothiocyanate sulforaphane, and a polyphenol curcumin showed the decrease of the PEPCK gene expression. Furthermore, we elucidated the mechanisms of suppression of the PEPCK gene expression by these food constituents.

研究分野：農学

キーワード：インスリン イソチオシアネート クルクミン ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ シグナル伝達経路

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。

### 1. 研究開始当初の背景

私どもはインスリン誘導性転写因子としてラット *SHARP-1*、および *SHARP-2* (*SHARPs*) 遺伝子を同定し、それらが、肝の糖新生系酵素 (血糖上昇作用のマーカー) をコードする *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)* 遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。したがって *SHARPs* がインスリンによる血糖低下に関与する転写因子の一つであると考えている。

食品成分には様々な生理活性を有することが知られているが、肥満予防に効果があるとされ、注目を集めている食品成分にポリフェノール類がある。

日本における糖尿病患者数の急増に注目し、私どもは、*SHARPs* 遺伝子を指標に血糖低下作用を示す食品由来成分のスクリーニングに取り組んできた。その結果、*SHARPs* mRNA の発現を誘導できる生理活性物質として、ポリフェノール類の緑茶カテキンの EGCG や大豆イソフラボンのゲニステインおよびダイゼインの腸内代謝産物である (*S*)-Equol を同定した。

一方、最近では、ワサビの辛味成分でイソチオシアネート類の 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate (6-MSITC) が、ラット高分化型肝癌細胞株である H4IIE 細胞において *SHARPs* とは独立して、糖新生系酵素の *PEPCK* mRNA 量を減少させることを見出し、それらのメカニズムを明らかにした。そこで本研究では、ブロッコリーの成分でイソチオシアネート類のスルフォラファン (SFN) や、ウコンの成分でポリフェノール類のクルクミン (curcumin) の *PEPCK* 遺伝子の発現抑制メカニズムを明らかにする (右図)。

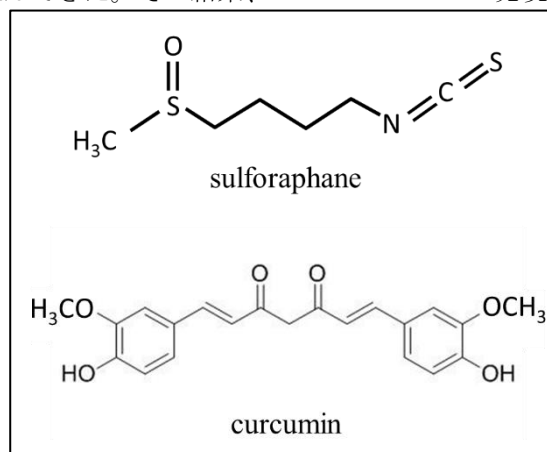


図 SFN と curcumin の化学構造式

### 2. 研究の目的

本研究では、SFN および curcumin による *PEPCK* 遺伝子発現抑制メカニズムの解析を行うために以下の実験を行った。

- (1) SFN および curcumin による *PEPCK* 遺伝子の発現抑制の解析
- (2) SFN および curcumin による *PEPCK* 遺伝子発現抑制メカニズムの解析
- (3) SFN および curcumin による *PEPCK* 遺伝子の転写抑制機構の解析

### 3. 研究の方法

- (1) SFN および curcumin による *PEPCK* 遺伝子の発現抑制の解析

H4IIE 細胞は、ダルベッコ変法イーグル培地に 10% ウシ胎児血清を加えたものを培養液とし、5% CO<sub>2</sub>、37°C で 24 時間培養した。さらに dexamethasone 存在下で 24 時間培養後、様々な濃度・時間で各食品成分で処理を行った後、total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用いて細胞内における *PEPCK* mRNA の発現量を測定した。

- (2) SFN および curcumin による *PEPCK* 遺伝子発現抑制メカニズムの解析

インスリンによるシグナル伝達経路に関わる各シグナル分子の阻害剤で前処理した後、各食品成分で 4 時間処理を行った。これらの細胞から total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法によって *PEPCK* mRNA の発現量を測定した。

- (3) SFN および curcumin による *PEPCK* 遺伝子の転写抑制機構の解析

SFN および curcumin による *PEPCK* mRNA の発現低下が転写阻害剤の actinomycin D で干渉された場合、*PEPCK* 遺伝子のプロモーター領域の解析を行う。

*PEPCK* 遺伝子の転写開始点上流 0.5 kb までのこの領域には、肝臓特異的発現とインスリン・グルカゴン・グルココルチコイドに応答するすべての領域が含まれている。この DNA 断片を挿入したルシフェラーゼリポータープラスミド (pr*PEPCK*/Luc (-467+69)) を、リポフェクション法を用いて H4IIE 細胞にトランスフェクションした後、dexamethasone 存在下の生理的条件のもと各食品成分の存在下・非存在下で培養した。細胞溶解後、Dual-Luciferase assay system にてルシフェラーゼ活性を測定した。

### 4. 研究成果

- (1) SFN および curcumin による *PEPCK* 遺伝子の発現抑制の解析

*PEPCK* mRNA の発現誘導は、SFN および curcumin により濃度依存的に抑制されることが明らかとなった。また各食品成分の処理により 4 時間と早期に抑制されることが明らかになった。

## (2) SFN および curcumin による PEPCK 遺伝子発現抑制メカニズムの解析

シグナル伝達経路を同定するために各種シグナル分子の阻害剤で処理した。

SFN による PEPCK 遺伝子発現抑制は、protein kinase C (PKC) の阻害剤である staurosporine、novel PKC (nPKC) の選択的阻害剤である rottlerin、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の阻害剤である PD98059 および U0126、AMP-activated protein kinase の阻害剤である compound C、転写阻害剤である actinomycin D (AD) により有意に阻害した。また、nPKC の活性化剤であるホルボールエステルの phorbol-12-myristate-13-acetate で H4IIE 細胞を処理すると PEPCK mRNA の発現が抑制された。さらにウェスタンブロット解析を行ったところ、SFN 処理後経時的に活性化型であるリン酸化 MAPK が有意に増加した。これらの結果から、SFN による PEPCK mRNA の発現抑制は nPKC および MAPK の活性化が関与すること、また転写レベルで生じている可能性が示唆された。

Curcumin による PEPCK 遺伝子発現抑制は、転写阻害剤である AD により完全に阻害された。この結果から、curcumin による PEPCK 遺伝子の発現抑制は転写レベルで生じている可能性が示唆された。

## (3) SFN、curcumin による PEPCK 遺伝子の転写抑制機構の解析

SFN は PEPCK 遺伝子のプロモーター活性を低下させることが示された。次に、PEPCK 遺伝子プロモーターを 5'側から欠失させた deletion construct を用いて、SFN 処理後のプロモーター活性を測定した。その結果、SFN に応答する転写調節配列は、PEPCK 遺伝子プロモーターの -467~-315 までに存在することが示された。さらに、-467~-315 領域内の応答エレメントに、部位特異的変異導入したプラスミドを構築し、SFN 処理後のプロモーター活性を測定した結果、SFN に応答する転写調節配列は、グルココルチコイド受容体の結合部位 (glucocorticoid receptor-binding sites) である GR2 と、accessory factor-binding sites (AF) である AF3 配列に存在することが示された。

Curcumin も PEPCK 遺伝子のプロモーター活性を低下させることが示された。また、curcumin に応答する転写調節配列は、-467~-315 までに存在すること、さらに、AF3 配列に存在することが示された。

以上の結果から、SFN による PEPCK 遺伝子の発現抑制は、nPKC および MAPK 経路を介すること、SFN は PEPCK 遺伝子の転写を抑制し、そして SFN の応答配列は、PEPCK 遺伝子プロモーターの -467~-315 領域に存在する GR2 と AF3 である可能性が示された。Curcumin もまた PEPCK 遺伝子のプロモーター活性を低下させ、また curcumin に応答する転写調節配列は、-467~-315 までに存在すること、さらに、AF3 配列に存在する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三鬼 由里江、高木 勝広
2. 発表標題 スルフォラファンによる糖新生系酵素 PEPCK 遺伝子の発現調節機構の解析
3. 学会等名 日本食品化学学会
4. 発表年 2019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
---------	---------