

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月2日現在

機関番号：33604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500798

研究課題名（和文） 高炭水化物食誘導性転写因子の包括的研究

研究課題名（英文） Studies on high carbohydrate diet-induced transcription factors.

研究代表者

山田 一哉（YAMADA KAZUYA）

松本大学・大学院健康科学研究科・教授

研究者番号：20263238

研究成果の概要（和文）：SHARP-1 および SHARP-2 は高炭水化物食誘導性転写因子である。私どもは、これらの因子がインスリンによる肝臓での糖新生の低下に起因する血糖低下に関与していると考えている。本研究では、これらの遺伝子の発現を制御するメカニズムの解析を行った。その結果、インスリンが SHARP-1 mRNA を誘導すること、AMP-activated protein kinase は SHARP-1 遺伝子の発現に関与するが、SHARP-2 遺伝子の発現には関与しないこと、大豆イソフラボンのゲニステインや緑茶カテキンの EGCG はこれらの遺伝子の発現をインスリンと同様非常に早期に誘導することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Both SHARP-1 and SHARP-2 are high carbohydrate diet-induced transcription factors. We assume that these factors are involved in the lowering of blood glucose level via a suppression of hepatic gluconeogenesis by insulin. In this study, a mechanism(s) controlling expressions of these genes was analyzed. As the results, we showed that insulin induced the level of SHARP-1 mRNA, gene expression of SHARP-1 but not SHARP-2 was regulated by AMP-activated protei kinase, and that genistein, a soybean isoflavone, and EGCG, a green tea polyphenol, rapidly induced these gene expressions as well as insulin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：インスリン、高炭水化物食、SHARP、時計遺伝子、血糖調節、食品成分

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の発症には遺伝的な素因に加えて、近年、環境要因として食生活の関与が大きく取り上げられている。実際、高炭水化物食や高脂肪食などの高エネルギー食の摂取により、肥満やインスリン抵抗性が引き起

こされ、さらに糖尿病・動脈硬化症などの生活習慣病の発症が惹起される。したがって、予備軍を含めて約 2,210 万人といわれる糖尿病患者の治療や発症の予防や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に対する対策は急務となって

いる。そのためには、インスリンによる遺伝子発現の制御機構の解明という基礎的研究とともにインスリンに代わる成分の探索や開発という応用的研究も求められている。

2. 研究の目的

本研究では、血糖調節や肥満・糖尿病発症に関与する可能性のある転写因子 SHARP ファミリーに注目して、生体内での生理的役割の解析、AMP-activated protein kinase (AMPK) や脂肪細胞由来のアディポネクチンによる発現制御機構の解析を行うとともに、食品成分由来の SHARP ファミリー遺伝子の発現制御因子のスクリーニングを行い、抗肥満・抗糖尿病効果を有する生理活性物質を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

【インスリンによる SHARP-1 遺伝子発現の調節】

インスリン応答性ラット肝癌細胞株である H4IIE 細胞を、様々な濃度・時間でインスリン処理した。これらの処理を行った細胞から total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用いて SHARP-1 mRNA の発現量を測定した。

【AMPK の関与】

アディポネクチンは肝臓の AMPK 活性を上昇させることにより糖新生を抑制することが知られている。そこで、H4IIE 細胞を、AMPK の化学的活性化剤である AICAR で様々な濃度・時間で処理した。これらの処理を行った細胞から total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用いて SHARP-1 および SHARP-2 mRNA の発現量を測定した。また、AMPK の阻害剤である Compound-C で処理を行い、その影響も検討した。

【食品成分の探索】

血糖降下作用を有することが知られている食品成分である大豆イソフラボン・緑茶カテキンで、H4IIE 細胞を様々な濃度・時間で処理した。これらの処理を行った細胞から total RNA を調製し、リアルタイム PCR 法を用いて SHARP-1 および SHARP-2 mRNA の発現量を測定した。次に、そのシグナル伝達経路を解析するために、各種シグナル伝達分子の阻害剤やドミナント変異型シグナル分子を発現させ、食品成分の活性に対する影響を検討した。

4. 研究成果

【インスリンによる SHARP-1 遺伝子発現

の調節】

H4IIE 細胞をインスリン処理したところ、SHARP-1 mRNA は、インスリン濃度依存的に誘導され、100 nM でピークに達した。また、SHARP-1 mRNA は、SHARP-2 mRNA と同様、2 時間と早期に誘導される結果を得た。

【AMPK の関与】

H4IIE 細胞を AMPK の活性化剤である AICAR 処理したところ、SHARP-1 および SHARP-2 mRNA ともに、AICAR 濃度依存的に誘導され、0.25 mM でピークに達した。また、2 時間と早期に誘導される結果を得た。

AICAR による SHARP-2 mRNA の誘導は、AMPK の阻害剤である Compound C で阻害されなかったが、SHARP-1 mRNA の誘導は阻害された。したがって、AICAR は異なるメカニズムで、SHARP-1 および SHARP-2 遺伝子に作用する可能性が示唆された。

【食品成分の探索】

・大豆イソフラボン Genistein

大豆イソフラボンのうち、*in vivo* で血糖降下作用が知られている Genistein と Daidzein について検討を行った。その結果、Genistein のみ、インスリンと同様 2 時間と非常に早期に SHARP-2 遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。各種のシグナル伝達分子の阻害剤を用いた実験から、この誘導はインスリンによる SHARP-2 遺伝子発現の誘導機構と異なり、Protein kinase C (PKC) 経路が関与することが明らかになった。PKC には様々なアイソフォームが存在するため、Genistein が、どのアイソフォームを活性化するかについて解析した。まず、classical PKC の活性化剤である PMA で H4IIE 細胞を処理したところ、SHARP-2 遺伝子の発現は、Genistein 処理と同様 2 時間と非常に早期に誘導された。次に、Genistein で処理した H4IIE 細胞から全細胞抽出液を調製し、classical PKC のうち PKC α に対する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、Genistein 処理後 5 分から 15 分で一過性に活性化型 (リン酸化型) PKC α が誘導されることが明らかになった。一方、非リン酸化型 PKC α 量には変動は認められなかった。また、Genistein による SHARP-2 mRNA の誘導は、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼの阻害剤である Actinomycin D で阻害された。したがって、Genistein は PKC α の活性化を介して転写レベルで SHARP-2 遺伝子の発現を誘導すると結論した。以上の結果をまとめて、英文学術論文として報告した (*Front. Biosci.* **E3**, 1534-1540 (2011))。

・緑茶カテキン EGCG

SHARP-2 の遺伝子発現は、EGCG により

早期に誘導されることを報告している。ここでは、EGCG による SHARP-1 遺伝子の発現調節について検討を行った。SHARP-1 遺伝子の発現は、EGCG により濃度依存的に、かつインスリンと同様 2 時間と非常に早期に誘導されることが明らかになった。この誘導は、PI3-K 経路の阻害剤である LY294002、PKC 経路の阻害剤である Staurosporin、AMPK 経路の阻害剤である Compound-C、Nuclear Factor- κ B 経路の阻害剤である BAY11-7082、ならびに DNA 依存性 RNA ポリメラーゼの阻害剤である Actinomycin D 処理により部分的に阻害された。また、PI3-K の下流に存在する PKC のシグナル分子である aPKC λ がこの誘導に関与するかどうかを検討した。ドミナントネガティブ変異の aPKC λ を発現するアデノウイルスの感染により、EGCG による誘導は抑制された。加えて、aPKC λ のリン酸化レベルは、EGCG 処理 5 分後で増加し、これ以降は速やかに減少すること、全 aPKC λ タンパク量には変動が認められないことも明らかにした。一方、EGCG 処理や NF- κ B の強発現は、SHARP-1 遺伝子の -1501 から -1 の領域のプロモーター活性に影響しなかった。以上より、EGCG による SHARP-1 遺伝子の発現誘導には PI-3K/aPKC λ 、AMPK、および NF- κ B の 3 つのシグナル伝達経路が関与すること、また SHARP-1 遺伝子の -1501 から -1 の領域には EGCG および NF- κ B に応答する転写調節領域は存在しないと結論した。以上の結果をまとめて、英文学術論文として 2 報刊行した (*J. Agr. Food Sci.* **59**, 13360-13364 (2011) および *Food Chem.* (in press))。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 山田一哉、羽石歩美、高木勝広、浅野公介：インスリン誘導性転写因子 SHARP-2 遺伝子の発現を誘導できる大豆成分の検索。大豆たんぱく質研究 **12**, 125-128 (2009) 査読無
2. Haneishi, A., Takagi, K., Asano, K., Nakamura, S., Kagawa, N., and Yamada, K.: Genistein stimulates the insulin-signaling pathway. *Front. Biosci.* **E3**, 1534~1540 (2010) 査読有
3. 羽石歩美、高木勝広、浅野公介、山田一哉：ゲニステインによるインスリン誘導性転写因子 SHARP-2 の発現調節機構の解析。 *New Food Industry* **53**, 1-8 (2011) 査読無

4. Asano, K., Takagi, K., Haneishi, A., Yamamoto, T., Tanaka, T., Noguchi, T., Nakamura, S., and Yamada, K.: (-)-Epigallocatechin-3-gallate enhances the expression of an insulin-inducible transcription factor gene via a phosphoinositide 3-kinase/ atypical protein kinase C lambda pathway. *J. Agr. Food. Chem.* **59**, 13360-13364 (2011) 査読有

5. Asano, K., Takagi, K., Haneishi, A., Nakamura, S., and Yamada, K.: (-)-Epigallocatechin-3-gallate stimulates both AMP-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Food Chem.* (印刷中) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 羽石歩美、高木勝広、浅野公介、山田一哉：ゲニステインによるインスリン誘導性転写因子 SHARP-2 遺伝子の発現誘導機構の解析。第 82 回日本生化学会大会。2009 年 10 月 23 日 神戸
2. Haneishi, A., Takagi, K., Asano, K., Yamada, K.: (-)-epigallocatechin-3-gallate regulates the gene expression of an insulin-inducible transcription factor, SHARP-2. 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会。2010 年 12 月 7 日 神戸
3. 羽石歩美、高木勝広、浅野公介、山田一哉：インスリン誘導性転写因子 SHARP-2 遺伝子の EGCG による発現制御機構の解析。第 84 回日本生化学会大会。2011 年 9 月 7 日 京都
4. 高木勝広、浅野公介、羽石歩美、山田一哉：インスリン誘導性転写因子 SHARP-1 のシグナル伝達機構の解析。第 84 回日本生化学会大会。2011 年 9 月 7 日 京都

[図書] (計 4 件)

1. 川崎祥二、古庄律、杉山芳宏、曾根英行、田中直子、沼波秀樹、真鍋芳江、山田一哉：生物学—ヒトと環境の生命科学—。pp.105-128 建帛社、2009 年
2. 田島眞、麻生慶一、有井康博、小栗重行、田中直子、山田一哉、吉川尚志、吉田徹：基礎からのやさしい化学—ヒトの健康と栄養を学ぶために—。pp.3-25, 53-59 建帛社、2011 年
3. 山田一哉ほか：新臨床栄養学増補版。pp.155-163 医学書院 2011 年
4. 大村正史、本美保子、山田一哉：管理栄養士養成課程「栄養管理と生命科学シリーズ」化学・生化学。pp.3249-281, 理工図書、2011 年

〔その他〕
ホームページ等
http://www.matsumoto-u.ac.jp/matsumoto_u/teacher_hp/yamada/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 一哉 (YAMADA KAZUYA)

松本大学・大学院健康科学研究科・教授

研究者番号：20263238