

令和 7 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K02134

研究課題名（和文）食材ポリアセチレン化合物による肝細胞エネルギー代謝制御機構の統合的解析

研究課題名（英文）Effect of polyacetylene compounds from edible plants on regulation of energy 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・講師

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。本研究による肝臓由来細胞株を用いた解析からfalcarindiol類がインスリンシグナル伝達経路や細胞内エネルギーセンサーに関わるタンパク質のリン酸化状態を変化させて糖新生を抑制する新たな作用機序が示唆された。本成果は糖新生の亢進がみられる病態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が期待できる。

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細胞内エネルギーセンサーに対する作用機序の一部を明らかにした。本成果は、falcarindiol類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が多いセリ科野菜の食品機能性素材としての新たな有用性を示唆するものであり、ウド等のウコギ科植物の薬用植物資源としての有効活用が期待される。

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 hepatoma cell line suggested that inhibit gluconeogenesis by affecting the phosphorylation state of protein kinases involved in the insulin signaling pathway and intracellular energy sensors. This result is basic research into functional food substances that regulate pathological conditions involving increased gluconeogenesis, and is also 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 GSK-3 インスリン 糖新生 セリ科植物 ポリアセチレン化合物 肝細胞 機能性物質

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 (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主な要因とする高血糖状態で、糖尿病全体の 90%以上を占めており世界的に患者数が増加している。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糖尿病合併症を引き起こすことから、その予防・治療法の多面的な研究開発が今後とも重要である。申請者らは、新たな作用機序に基づく 2 型糖尿病予防・治療剤としてグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)) を阻害する物質に注目してきた。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、糖尿病態において GSK-3 の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。一方、AMPK(AMP-activated protein kinase)は肝臓・筋肉・脂肪組織にて細胞のエネルギー代謝の調節因子として重要な役割を担うタンパク質リン酸化酵素である。AMPK の活性化は糖尿病、肥満、加齢等に関連した疾病の治療標的としても重要視されている。近年、GSK-3 と AMPK は複合体を形成することが明らかにされ、両者の活性制御物質はエネルギー代謝制御機構に関連する各種疾病の解析や予防に有効であることが期待できる。

申請者らは、真核生物のモデル生物である出芽酵母の遺伝子変異株を利用した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。これまでに、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 falcarindiol 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 H4IIE における糖新生律速酵素の遺伝子発現が falcarindiol 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される可能性が得られた。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、falcarindiol 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。しかし、天然物化合物は複数の作用機序をもつ場合が多いことから、今後は AMPK 等に関わる作用機序の全様を明らかにすることが重要である。

### 2. 研究の目的

本研究は、falcarindiol 類の肝細胞におけるインスリンシグナル伝達経路および栄養シグナル伝達経路に対する生物活性を解析し、食材由来のポリアセチレン化合物による糖代謝を中心としたエネルギー代謝制御機構の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞生存率を指標とした AMPK 活性化作用の検討

細胞生存率を Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いた WST-8 アッセイで評価した。細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  細胞/ウェルで播種して約 24 時間培養後、培地で希釈した被験物質と AMPK 阻害剤を添加して 24 ~ 48 時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8 をそれぞれのウェルに 10  $\mu$ l ずつ加えてから 4 時間後にマイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の波長で吸光度を測定した。無細胞ウェル群の吸光度をブランクとして差し引き、溶媒添加群をコントロールとして各サンプル処理群の細胞生存率を算出した。

#### (2)肝臓由来細胞のシグナル伝達経路に対する作用機序の解析

H4IIE 細胞を 12-ウェルマイクロプレートに  $2 \times 10^5$  細胞/ウェル播種して 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、falcarindiol 類または市販の各種阻害剤を培地に加えて糖新生の調節機構に関わるシグナル伝達分子のタンパク質発現量およびタンパク質リン酸化量の変化をウエスタンブロット法で解析した。

#### (3)細胞内 ATP 産生に対する影響の解析

細胞内 ATP 量を ATP Assay Kit-Luminescence (同仁化学研究所) を用いた化学発光法で評価した。細胞を 96 ウェル白色オプティカルボトムプレートに  $1 \times 10^4$  細胞/ウェルで播種して約 24 時間培養後、培地で希釈した被験物質を添加して 6 ~ 24 時間培養した。その後、ATP Assay Kit working solution をそれぞれのウェルに 100  $\mu$ l ずつ加えてから 2 分間振盪し 25  $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーション後、マイクロプレートリーダーを用いて化学発光量(RLU)を測定した。ATP 検量線を基に細胞内 ATP 量を定量し、溶媒添加群をコントロールとして各サンプル処理群の細胞内 ATP 量を比較した。

#### (4)サーチュイン活性化/阻害活性の解析

組換えヒト SIRT1 酵素活性の活性化作用/阻害活性を、FLUOR DE LYS SIRT1 fluorometric drug discovery assay kit (Enzo Life Sciences) を用いた蛍光法で解析した。96 ウェル黒色プレートに各種試薬と被験物質を混合し 37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、反応停止剤とデベロッパーを添加し

25 で 45 分間反応させマイクロプレートリーダーを用いて蛍光量(RFU)を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1)細胞生存率を指標とした AMPK 活性化作用の検討

H4IIE 細胞に metformin を 48 時間処理すると細胞生存率が濃度依存的に減少したが、AMPK 阻害剤 compound C を共処理すると細胞生存率が有意に回復した。このことから、H4IIE 細胞において metformin と compound C を共処理したときに細胞生存率が回復する化合物は metformin 様の AMPK 活性化作用を有することが期待できる。同条件下で、H4IIE 細胞に falcarindiol を 24 時間処理すると 100  $\mu\text{M}$  において細胞生存率が濃度依存的に低下し、compound C を共処理すると細胞生存率が共処理しない場合と比較して有意に増加した(図 1)。したがって、falcarindiol の H4IIE 細胞に対する作用機序の一部は AMPK 活性化が関与することが示唆された。

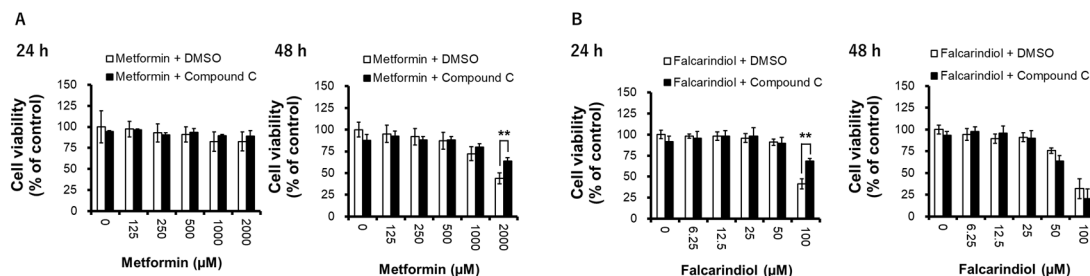


図 1 AMPK 阻害剤 compound C 共処理による H4IIE 細胞の細胞生存率に対する影響 (A: Metformin, B: falcarindiol, mean  $\pm$  SD (n=3), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (vs. + DMSO))

##### (2)肝臓由来細胞のシグナル伝達経路に対する作用機序の解析

H4IIE 細胞に metformin を作用させると AMPK 活性化の指標となる AMPK のリン酸化量の増加が時間依存的に認められた。同条件下で、falcarindiol を H4IIE 細胞に作用させると処理時間 1 時間後まで AMPK のリン酸化量が濃度依存的に増加した。この結果から、falcarindiol は AMPK を活性化して糖代謝や脂質代謝を促進する可能性が示唆された(図 2)。Falcarindiol の作用機序は GSK-3 の阻害活性に加えて AMPK 活性化を誘導していることが示唆されたことから、作用機構の全容を明らかにするためには AMPK 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。また、インスリンシグナル伝達経路の下流への影響を解析したところ、H4IIE 細胞に falcarindiol を作用させると p70S6 kinase のリン酸化の亢進がみられ、その作用は mTOR 阻害剤の rapamycin を共処理すると打ち消された。

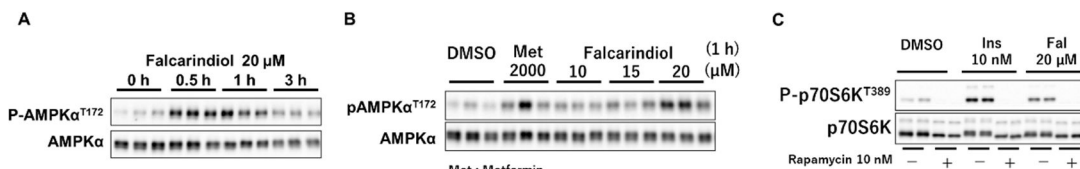


図 2 H4IIE 細胞における falcarindiol の AMPK および p70S6K のリン酸化量に対する影響

##### (3)細胞内 ATP 産生に対する影響の解析

Metformin は 2 型糖尿病の治療薬として処方されており作用機序は完全には明らかにされていないが、metformin 等のピグアナイド系糖尿病治療薬により肝臓での糖新生が抑制されることが知られている。Metformin によりミトコンドリア電子伝達系の呼吸鎖を阻害されることが知られており、これは細胞のエネルギー代謝のセンサーである AMPK タンパク質の活性化を介したものと考えられている。そこで、falcarindiol の H4IIE 細胞における細胞内 ATP 産生量に対する影響を解析した。H4IIE 細胞に falcarindiol を 3.125 ~ 100  $\mu\text{M}$  の濃度で作用させると、処理後 6 時間においては細胞内 ATP 量に有意な変化が認められなかったが、処理後 24 時間で 100  $\mu\text{M}$  で細胞内 ATP 量が有意に減少した(図 3)。したがって、falcarindiol の H4IIE 細胞における AMPK 活性化作用は細胞内 ATP 量の減少を誘導する作用が関与していることが示唆された。

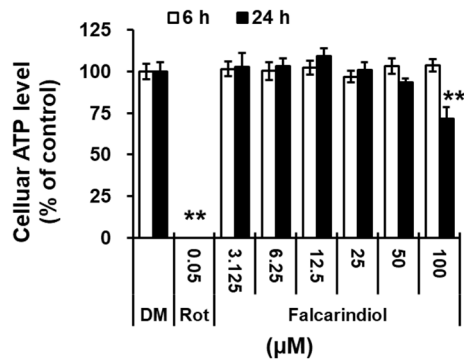


図3 H4IIE細胞のATP量に対するfalcarindiolの影響

(DM: DMSO, Rot: Rotenone, mean ± SD (n=4), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (vs. DMSO))

(4) サーチュイン活性化/阻害活性の解析

Sirtuin (SIRT) ファミリーは  $NAD^+$  依存的タンパク質脱アセチル化酵素で、遺伝子発現や細胞周期等様々な生命現象を制御している。また、SIRT1 は AMPK と相互作用することで老化やエネルギー代謝の重要な調節因子であることが示唆されている。そこで、組換えヒト SIRT1 と蛍光プローブ結合ペプチド基質を用いた市販のキットを用いて falcarindiol の SIRT1 に対する直接的な活性化作用または阻害作用を測定した。その結果、SIRT1 阻害剤 suramin sodium の  $IC_{50}$  値=3.1  $\mu M$ 、SIRT1 活性化剤の resveratrol の  $EC_{50}$ =5.1  $\mu M$  の条件下で、falcarindiol は SIRT1 を  $IC_{50}$  値 164.6  $\mu M$  で阻害した。Falcarindiol の組換えヒト SIRT1 酵素に対する直接的な活性化作用はみられず、高濃度では阻害活性が認められた(図4)。したがって、falcarindiol の H4IIE 細胞に対する AMPK 活性化作用に SIRT1 活性化が関連する可能性が低いと予想される。

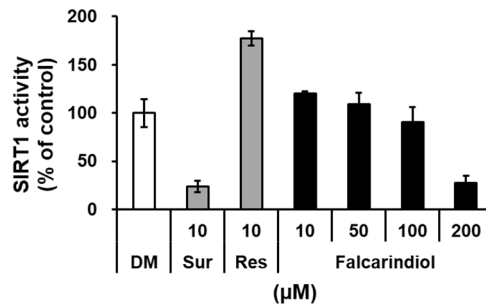


図4 Falcarindiol のヒト SIRT1 酵素阻害活性

(DM: DMSO, Sur: Suramin sodium, Res: Resveratrol)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sofian Ferry Ferdiansyah, Kurniawati Nurriszka, Yoshida Jun, Ito Yoshiaki, Tchoukoua Abdou, Tabopda Turibio Kuate, Lannang Alain Meli, Ngadjui Bonaventure Tchaleu, Koseki Takuya, Shiono Yoshihito	4. 巻 56
2. 論文標題 New fatty acid ester and meroterpenoid produced by the endophytic fungus <i>Penicillium</i> sp. NR-1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 5~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytol.2023.05.013	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 Abdou, Tomfeun Nganou Sandrine Carole, Dabole Bernard, Yoshida Jun, Ito Yoshiaki, Ngadjui Bonaventure Tchaleu, Shiono Yoshihito	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) 10.1016/j.phytol.2021.04.007	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 Sofian Ferry Ferdiansyah, Warahapsari Fatimah Ayu, Yoshida Jun, Ito Yoshiaki, Koseki Takuya, Shiono Yoshihito	4. 巻 -
2. 論文標題 Two new octahydronaphthalene derivatives, trichodermic acids C and D produced by <i>Trichoderma</i> sp. HN-1.1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14786419.2021.1983811	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 Sofian Ferry Ferdiansyah, Suzuki Takuma, Supratman Unang, Harneti Desi, Maharani Rani, Salam Supriatno, Abdullah Fajar Fauzi, Yoshida Jun, Ito Yoshiaki, Koseki Takuya, Shiono Yoshihito	4. 巻 -
2. 論文標題 The 2,3-epoxy naphthoquinol produced by endophyte <i>Arthrimum marii</i> M-211	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14786419.2021.1998899	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松本千里、鈴木瑞季、吉田潤、武田令子、近藤恵二、伊藤芳明、木村賢一
2. 発表標題 久慈産琥珀メタノール抽出物でマウス骨格筋由来C2C12筋管細胞に対し新たに認められた生物活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2025年度大会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 吉田潤、工藤唯、伊藤芳明、木村賢一
2. 発表標題 久慈産琥珀から得られるspirolactone norditerpenoidの肝細胞における糖新生抑制作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Jun Yoshida, Yusuke Okawa, Takuya Oyama, Nozomu Shimoda, Shota Uesugi, Hiroshi Takagi, Yoshiaki Ito, Ken-ichi Kimura
2. 発表標題 Analysis of functional mechanism and target molecules of ricinoleic acid derived from castor oil
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Yoshida, Shota Uesugi, Tetsuaki Kawamura, Ken-ichi Kimura, Dawei Hu, Shuang Xia, Naoki Toyooka, Masao Ohnishi, Hideki Kawashima
2. 発表標題 Bioactive properties of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in eukaryotic cells
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究 分担者	木村 賢一  (Kimura Ken-ichi)  (30344625)	岩手大学・農学部・教授   (11201)	
研究 分担者	伊藤 芳明  (Ito Yoshiaki)  (50312517)	岩手大学・農学部・教授   (11201)	

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